

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FELIPE FRANCISCO

**ACÚMULO DE BIOMASSA, PRODUÇÃO DE ESTEVIOSÍDEO E
REBAUDIOSÍDEO A E TOLERÂNCIA À GEADA E AO ACAMAMENTO
DE ACESSOS DE *Stevia rebaudiana* Bert.**

**CURITIBA
2015**

FELIPE FRANCISCO

**ACÚMULO DE BIOMASSA, PRODUÇÃO DE ESTEVIOSÍDEO E
REBAUDIOSÍDEO A E TOLERÂNCIA À GEADA E AO ACAMAMENTO
DE ACESSOS DE *Stevia rebaudiana* Bert.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Cícero Deschamps

**CURITIBA
2015**

F819 Francisco, Felipe

Acúmulo de biomassa, produção de esteviosídeo e rebaudiosídeo e a tolerância à geada e ao acamamento de acessos de *Stevia rebaudiana* Bert. / Felipe Francisco. – Curitiba, 2015.

72 f. : il. : color

Orientador: Cícero Deschamps

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal.

1. *Stevia rebaudiana* – Cultivo. 2. Plantas açúcareiras. 3. Adoçantes dietéticos. I. Deschamps, Cícero. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal. III. Título

CDU 633.6



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL

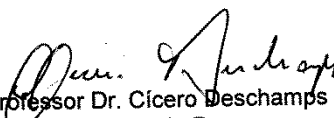


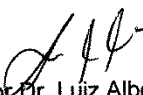
PARECER

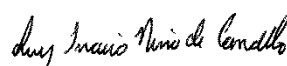
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pelo candidato **FELIPE FRANCISCO**, sob o título "**ACÚMULO DE BIOMASSA, PRODUÇÃO DE ESTEVIOSÍDEO E REBAUDIOSÍDEO A E TOLERÂNCIA À GEADA E AO ACAMAMENTO DE ACESSOS DE *Stevia rebaudiana* Bert.**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.


Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

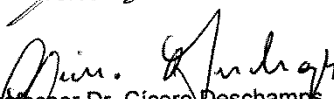
Curitiba, 24 de Fevereiro de 2015.


Professor Dr. Cícero Deschamps
Coordenador do Programa


Professor Dr. Luiz Alberto Kanis
Primeiro Examinador


Professor Dr. Ruy Inácio Neiva de Carvalho
Segundo Examinador


Professor Dr. Atila Francisco Mógor
Terceiro Examinador


Professor Dr. Cícero Deschamps
Presidente da Banca e Orientador

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à minha maravilhosa família, na qual tive a grande benção de nascer! Pelo partilhar! Pelos ensinamentos! Pelo exemplo! Pela alegria! Pela dedicação! Pelo companheirismo! Pelo apelo humano! Muito obrigado!

À minha companheira, Gaby, pelo amor, paciência, amorosidade, companheirismo e imensa ajuda na realização deste trabalho!

Aos meus grandes amigos de todas as horas que auxiliaram neste trabalho e na minha vida, Sebastião e Rafael.

Aos que se tornaram meus irmãos no dia a dia de trabalho e me auxiliaram muito nos experimentos ao longo do mestrado, Laís, Wanderlei e Michele.

Aos senhores Altair, Lourival e Nelson que auxiliaram na condução dos experimentos com esmero e tornaram divertidas as incontáveis horas de avaliação.

Aos demais amigos do PGAPV que me auxiliaram: Roger, Gilnei, Paulo, Thalita, Mariana, Tales, Mirele, Carlos, Lucimara, Caroline, Maria Emília e aos demais que compartilharam comigo bons momentos de aprendizagem.

Agradeço, também, aos amigos que compõem grande parte de minha vida: Adão, Rosali, Gislaine, Daniel, Deborah, Fernando G., Fernando B., Bruno, Paulo, Guilherme, Gilda, Geraldo, Mayrlon, Aline, Claudemir, Douglas, Airtó, Marcia, Artanhan, Deysi, Fátima, Lúcia, Perillo, Jaqueline, Gilson, Baldessera, Lucas, Marcos, Fábio, André Assis, Deyvis, Rocio, Aline S., Zenilda, Juliano, Mariela, Iraci, Vandolir, Otto, Agno, Maria, Ferreira, Pará, Adriano, Otavio, Neto, Nicolau, dentre tantos outros.

À Bruna pelo apoio e participação no início desta jornada.

Às nossas amigas e companheiras Irena e Dete que tanto animam nosso dia a dia no departamento de fitotecnia!

Ao professor Dr. Cícero Deschamps pela orientação, pela autonomia e confiança depositada em mim, pelas sempre inspiradas ideias e por presentear-me com o mundo do metabolismo secundário de plantas! Aos demais professores do PGAPV que tanto me ensinaram, Dra. Raquel Negrelle, Dra. Katia Zuffellato, Dr. Antônio Biasi e Dr. Ricardo Oliveira.

Aos demais mestres, professores ou não, que me ensinaram muito ao longo da vida: Dr. Abdon Schmidt, Dr. Joshua Farley, Dr. Renato Irgang, Dr. Antônio Uberti, Dr. Antônio Rosa, Dr. Alfredo Fantini, Humberto Sório, Armélio, Glaico, Cláudio, Nilson, Renato, Jânio, Fabio, Nelito, Marcelo, Nazaré, Rui, Ângelo, Alden, Ige, Fabian e tantos outros.

Ao professor Dr. Luiz Alberto Kanis pela hospitalidade e por disponibilizar seu tempo e o laboratório TECFARMA, da Unisul, para realização das análises cromatográficas. À Larissa e ao Diego pelo auxílio na execução das análises.

Ao professor Dr. Antônio Biasi pela disponibilização do Laboratório de Micropropagação de Plantas da UFPR por mais de um ano para a propagação, cultivo de mudas e experimentação, além das sempre experientes orientações.

Ao professor Dr. Átila Mógor e ao Dr. Cirino Correia Junior pelas considerações realizadas na pré-defesa que auxiliaram na melhoria deste trabalho.

Ao Dr. Roberto Viana e à Embrapa CENARGEN por disponibilizar o material genético utilizado neste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa.

À Deus, por ter tanto a agradecer!

RESUMO

Stevia rebaudiana Bert. é uma espécie da família Asteraceae, herbácea, nativa do Brasil e Paraguai e economicamente importante devido à aplicação como adoçante não calórico. O poder adoçante advém da produção dos glicosídeos diterpênicos esteviosídeo (EST) e rebaudiosídeo A (RA) que são, respectivamente, 300 e 450 vezes mais doces que a sacarose e não são calóricos por não serem absorvidos no trato intestinal humano. A estévia também possui propriedades medicinais como anti-hiperglicêmica, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, antitumoral e antioxidante. No Brasil, o cultivo de estévia é incipiente e não há produção suficiente para atender a demanda do mercado interno. No ano de 2013, o Brasil importou acima de US\$ 8 milhões e exportou US\$ 2,7 milhões de estévia. Para o avanço do cultivo no Brasil, há carência de materiais genéticos com padrão industrial adaptados às condições edafoclimáticas de cada região produtora. O objetivo deste trabalho foi avaliar o acúmulo de biomassa, produção de EST e RA e tolerância à geada e ao acamamento de sete acessos de estévia nas condições climáticas da região metropolitana de Curitiba, PR. O plantio foi realizado na última semana de outubro de 2013 com espaçamento 25x50 cm, resultando em população de 80.000 plantas ha⁻¹. A produtividade de massa seca de folhas, índice de área foliar, área foliar específica, teores de EST e RA por HPLC, relação entre RA/EST, produtividade de EST e RA, tolerância à geada e ao acamamento e morfologia dos acessos foram avaliados. Os acessos 6, 7 e 14 apresentaram padrão químico exigido pela indústria com relação RA/EST próxima ou superior a 1 e produtividade de até 558,5 kg ha⁻¹ de EST e 553,1 kg ha⁻¹ de RA. Os acessos com maior altura e menores ramificação, índice de área foliar e área foliar específica são superiores em RA e relação RA/EST. Os acessos 4, 7 e 8 são os mais tolerantes à geada e os acessos 7 e 14 mais suscetíveis ao acamamento.

Palavras-chave: diabetes, adoçante, estévia, produtividade, morfologia.

ABSTRACT

Stevia rebaudiana (Bert.) is an herbaceous species of the family Asteraceae, native in Brazil and Paraguay economically because of its use as a non-caloric sweetener. Its sweetness is a result of the production of diterpene glycosides stevioside (ST) and rebaudioside A (RA), respectively, which are 300 and 450 times sweeter than sucrose and are non-caloric because they are not absorbed in the human intestinal tract. Stevia also has medicinal properties such as anti-hyperglycemic, anti-hypertensive, anti-inflammatory, antitumor and antioxidant. The Brazilian stevia cultivation is incipient and there is not enough production to meet the internal market. In 2013, Brazil imported over US\$8 million and exported US\$2.7 million of stevia. There is a lack of genetic materials with industry standard and adapted to growing conditions of each producing region. This study aimed to evaluate the potential production of ST and RA of seven stevia accessions in Cfb climate of Köppen. The planting was in the last week of October 2013 with spacing of 25x50 cm and population of 80,000 plants ha⁻¹. The production of leaf dry matter, leaf area index, specific leaf area, yield of EST and RA, RA/EST ratio, frost tolerance, morphology and lodging of accessions were evaluated. The accessions 6, 7 and 14 have chemical industrial standard with RA/EST ratio near or over 1 and productivity of 558.5 kg ha⁻¹ of EST and 553.1 kg ha⁻¹ of RA. The accessions high height, low branching, low index of leaf area and low specific leaf area are higher yield RA and ratio RA/EST. The accessions 4, 6, 7 and 8 are tolerant to frost and the accessions 7 and 14 are more susceptible to lodging.

Key words: diabetes, sweetener, productivity, morphology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Stevia rebaudiana Bert. aos 48 dias após o plantio, Pinhais, Paraná. 2014.....	14
Figura 2 -	Taxa de crescimento absoluto da parte aérea e raízes (a), relação entre parte aérea e raiz, relação entre massa seca de folhas e de ramos (b) e distribuição dos assimilados durante o desenvolvimento da cultura (c) de Stevia rebaudiana (LIMA FILHO, 2004).	17
Figura 3 -	Evolução das exportações e importações de <i>Stevia rebaudiana</i> no Brasil (BRASIL, 2014).	22
Figura 4 -	Curvas de calibração com cinco concentrações de padrão de esteviosídeo e rebaudiosídeo A Sigma [®]	29
Figura 5 -	Dendrograma de agrupamento químico com base nas distâncias Euclidianas de acessos de <i>Stevia rebaudiana</i> . Pinhais, 2014.	35
Figura 6 -	Principal Component Analysis (PCA) com base nos teores de EST e RA de acessos de Stevia rebaudiana. Pinhais, 2014.....	35
Figura 7 -	Temperatura mínima diária durante o experimento na estação meteorológica do SIMEPAR, localizada em Pinhais, PR.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estádios fenológicos de <i>Stevia rebaudiana</i> . Bogotá, Colômbia.	16
Tabela 2 -	Produtividade de MSF, teores de EST e RA e R/E em <i>Stevia rebaudiana</i> relatados na bibliografia científica.	20
Tabela 3 -	Condições climáticas durante o experimento. Pinhais, 2013/2014.	27
Tabela 4 -	Produtividade de MSF de acessos de <i>Stevia rebaudiana</i> . Pinhais, 2014.	31
Tabela 5 -	Teores de EST e RA na MSF de acessos de <i>Stevia rebaudiana</i> . Pinhais, 2014.	32
Tabela 6 -	R/E de acessos de <i>Stevia rebaudiana</i> . Pinhais, 2014.	33
Tabela 7 -	Produtividade de EST e RA de acessos de <i>Stevia rebaudiana</i> . Pinhais, 2014. .	34
Tabela 8 -	Condições climáticas ao longo do experimento. Pinhais, 2014.	43
Tabela 9 -	Produtividades de MSF, MSC, MST e distribuição da MSF nas regiões apical, mediana e basal de acessos de <i>Stevia rebaudiana</i> . Pinhais, 2014.	46
Tabela 10 -	Teor de RA e EST das regiões apical, mediana e basal de acessos de <i>Stevia rebaudiana</i> . Pinhais, 2014.	47
Tabela 11 -	R/E nas regiões apical, mediana e basal de acessos de <i>Stevia rebaudiana</i> . Pinhais, 2014.	48
Tabela 12 -	Correlação entre caracteres morfofisiológicos e componentes de rendimento de acessos de <i>Stevia rebaudiana</i> . Pinhais, 2014.	49
Tabela 13 -	IAF, AFE, RAF, RPF e número de ramos secundários e terciários de acessos de <i>Stevia rebaudiana</i> . Pinhais, 2014.	49
Tabela 14 -	Altura (m) e acamamento (%) de acessos de <i>eStevia rebaudiana</i> . Pinhais, 2014.	51
Tabela 15 -	Incidência de lesões (%) provocadas por geada nas diferentes regiões das plantas em acessos de <i>Stevia rebaudiana</i> . Pinhais, 2014.	60
Tabela 16 -	Área das folhas com lesão (%) provocadas por geada em acessos de <i>Stevia rebaudiana</i> . Pinhais, 2014.	61

LISTA DE SIGLAS

AFE	- Área Foliar Específica
ANOVA	- Análise de Variância
CAPES	- Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior
CEEx	- Centro de Estações Experimentais do Canguiri
CENARGEN	- Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia
CV	- Coeficiente de Variação
DAP	- Dias Após Plantio
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EST	- Esteviosídeo
ETP	- Evapotranspiração
EUA	- Estados Unidos da América
FDA	- Food and Drug Administration
FAO	- Food and Agriculture Organization of the United Nations
HPLC	- High Power Liquid Cromathography
IAF	- Índice de Área Foliar
MSC	- Massa Seca de Caule
MSF	- Massa Seca de Folhas
MST	- Massa Seca Total
PCA	- Principal Component Analysis
PRNT	- Poder Relativo de Neutralização Total
RA	- Rebaudiosídeo A
RAF	- Razão de Área Foliar
R/E	- Relação entre Rebaudiosídeo A e Esteviosídeo
RPF	- Razão de Peso de Folha
SMP	- Shoemaker, Mac Iean and Pratt Method
SIMEPAR	- Sistema Meteorológico do Paraná
SRE	- Somatório de Rebaudiosídeo A e Esteviosídeo
TCA	- Taxa de Crescimento Absoluto
UE	- União Europeia
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
WHO	- World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS	14
2.2 ASPECTOS ECOLÓGICOS.....	15
2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA	16
2.4 MORFOFISIOLOGIA	17
2.5 ASPECTOS AGRONÔMICOS	19
2.6 ASPECTOS ECONÔMICOS.....	21
3 ACÚMULO DE BIOMASSA E PRODUÇÃO DE ESTEVIOSÍDEO E REBAUDIOSÍDEO A EM ACESSOS DE <i>Stevia rebaudiana</i> Bert.....	24
3.1 INTRODUÇÃO.....	26
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.2.1 Características Edafoclimáticas do Experimento	27
3.2.2 Material Vegetal	27
3.2.3 Condução do Experimento	28
3.2.4 Avaliação do Experimento	28
3.2.5 Análise dos Teores de EST e RA.....	29
3.2.6 Agrupamento Químico	30
3.2.7 Delineamento Experimental e Estatística	30
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.3.1 Acúmulo de Biomassa	30
3.3.2 Teor e Produtividade de EST E RA	32
3.3.3 Análise de Agrupamento Químico.....	34
3.4 CONCLUSÃO.....	36
REFÊRENCIAS	37

4	MORFOFISIOLOGIA DE ACESSOS DE <i>Stevia rebaudiana</i> Bert.....	40
4.1	INTRODUÇÃO.....	42
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.2.1	Características Edafoclimáticas do Experimento	43
4.2.2	Material Vegetal.....	43
4.2.3	Condução do Experimento	44
4.2.4	Avaliação do Experimento	44
4.2.5	Análise dos Teores de EST e RA.....	45
4.2.6	Delineamento Experimental e Estatística	45
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.4	CONCLUSÕES.....	51
	REFERÊNCIAS	53
5	TOLERÂNCIA À GEADA DE ACESSOS DE <i>Stevia rebaudiana</i> Bert.....	55
5.1	INTRODUÇÃO.....	57
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	57
5.2.1	Características Edafoclimáticas do Experimento	57
5.2.2	Material Vegetal.....	58
5.2.3	Condições do Experimento.....	59
5.2.4	Avaliação do Experimento	59
5.2.5	Delineamento Experimental e Estatística	60
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.4	CONCLUSÕES.....	62
	REFERÊNCIAS	63
6	CONCLUSÕES GERAIS	65
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
	REFERÊNCIAS	69

1. INTRODUÇÃO GERAL

A estévia (*Stevia rebaudiana* Bert.) é uma espécie herbácea, pertence à família Asteraceae e possui altos teores de glicosídeos diterpênicos nas folhas. Seu valor econômico se dá pela capacidade adoçante destes compostos associada à ausência de potencial calórico (MONDAÇA *et al.*, 2012).

Os principais glicosídeos diterpênicos presentes na estévia são o esteviosídeo (EST) e o rebaudiosídeo A (RA) respectivamente 300 e 450 vezes mais doces que a sacarose (BRASIL, 2010).

Apresenta atividade anti-hiperglicêmica por meio da redução do nível de glicose no sangue apenas quando há nível acima do normal, o que torna seu uso seguro no tratamento da diabetes. Também possui atividade anti-hipertensiva, anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante, antidiarreico, diurética e ações imunomoduladoras (CHATSUDTHIPONG e MUANPRASAT, 2009).

A estévia ganhou espaço no mercado mundial na última década (SAAD *et al.*, 2014) diante os índices alarmantes das doenças relacionadas à dificuldade de regulação dos níveis de glicose no sangue e ao consumo excessivo de açúcar, como diabetes e obesidade (STEVENS *et al.*, 2012).

Em 2013 a diabetes acarretou 5,1 milhões de mortes e um gasto com saúde de US\$ 548 bilhões, afetou 371 milhões de pessoas e há estimativa de atingir 550 milhões de pessoas no mundo em 2030 (IDF, 2013).

A obesidade e o sobrepeso atingiram 12 e 22%, respectivamente, da população mundial em 2008 (STEVENS *et al.*, 2012). Segundo Bloom *et al.* (2011), a soma de todas as despesas com as doenças oriundas de sobrepeso e obesidade alcançaram US\$ 1,40 trilhões em 2010.

Os adoçantes sintéticos constituem importante alternativa mundialmente utilizada para controle de distúrbios como diabetes e sobrepeso (SAAD *et al.*, 2014). No entanto, pesquisas apontam riscos do seu consumo por causarem doenças como o câncer (KLIMKO, 2011; KIM *et al.*, 2014; SAAD *et al.*, 2014).

Neste contexto, a estévia surge como uma opção de adoçante natural saudável para dietas com redução de ingestão de açúcares e para auxílio no tratamento de algumas doenças (CHEN, *et al.*, 2005; MISRA *et al.*, 2011; SHIVANNA *et al.*, 2013; SINGH e GARG, 2014).

O cultivo de estévia se dá principalmente na China, que detém 80% da produção mundial. A produção global de estévia deve alcançar entre 8 a 11 bilhões de dólares em 2015 (INDUSTRYARC, 2014).

No Brasil o cultivo ainda é incipiente e não há produção suficiente para abastecer o mercado interno. Desta forma, o país importou US\$ 8 milhões e exportou US\$ 2,7 milhões em estévia em 2013 (BRASIL, 2014).

Dentre as dificuldades no cultivo de estévia, destaca-se a ausência de materiais genéticos adaptados a cada região produtora. Há poucos cultivares desenvolvidos no mundo e faltam estudos para o desenvolvimento de materiais genéticos com maior produtividade de folhas e teores de EST e RA (YADAV *et al.*, 2011).

A relação entre RA / EST (R/E) próxima ou superior a 1 é importante para indústria, pois o EST apresenta sabor residual amargo e baixa solubilidade em água enquanto o RA é solúvel e não apresenta sabor residual (CARDELLO *et al.*, 2000; MOTA *et al.*, 2011). A maioria dos acessos encontrados na natureza possui R/E muito baixa e este parâmetro tem sido considerado primordial em programas de melhoramento genético (YADAV *et al.*, 2011).

O centro de origem da estévia é a região da Serra do Amambai, entre o nordeste do Paraguai e o sudeste do estado do Mato Grosso do Sul (LIMA FILHO *et al.*, 2004), a qual apresenta clima Aw e Cwa de Köppen, com temperaturas médias de, respectivamente, 27 e 22 °C e baixa frequência de geadas.

A parte aérea da planta é suscetível à geada, porém, a base do caule resiste à temperatura do ar abaixo de 0 °C e, no cultivo em regiões com inverno rigoroso, a planta retoma brotação a partir da base do caule com a elevação da temperatura na primavera (MORAES *et al.*, 2013).

Populações selvagens de estévia apresentam grande variação na produção de EST e RA entre plantas individuais (YADAV *et al.*, 2011). Desta forma, o ensaio com distintos acessos de estévia pode resultar na obtenção de materiais genéticos superiores de interesse para indústria.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o acúmulo de biomassa, produção de EST e RA e tolerância à geada e ao acamamento de sete acessos de estévia na região metropolitana de Curitiba.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS

A estévia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) é uma espécie da família Asteraceae, herbácea, semi-ereta, com 40 a 80 cm de altura, muito ramificada, com raízes e rizomas semi-perenes a perenes e parte aérea anual (Figura 1) (KINGHORN, 2003; LORENZI e MATOS, 2008).



Figura 1 - *Stevia rebaudiana* Bert. aos 48 dias após o plantio, Pinhais, Paraná. 2014.

Possui folhas espatuladas a lanceoladas com dimensões máximas de 6 cm de comprimento e 2,5 cm de largura, simples opostas e alternadas quando próximas às inflorescências, sésseis, sem estípula, venação actinódroma (trinérvea), margem serrilhada e de coloração verde escuro na parte adaxial e verde claro na parte abaxial (BRASIL, 2010).

As inflorescências são corimbiformes. As flores são alvas, actinomorfas, corola com cinco lobos perfeitos, agrupadas em capítulos, com brácteas ao entorno. Os frutos são aquênios isomórficos com cerca de 15 aristas cerdosas e simétricas de superfície pilosa e pappus com uma fileira de cerdas (LIMA FILHO *et al.*, 2004).

O caule é ereto, piloso ou não, frágil e ramificado. As raízes são fibrosas, ramificadas e não aprofundam (KINGHORN, 2003).

2.2 ASPECTOS ECOLÓGICOS

O centro de origem da estévia é a região da serra do Amambai que compreende o nordeste do Paraguai e parte do estado de Mato Grosso do Sul (LIMA FILHO *et al.*, 2004). Esta região possui clima Aw e Cwa de Köppen com temperaturas médias de, respectivamente, 27 e 22 °C e baixa frequência de geadas.

A parte aérea da estévia é suscetível à geada. Em condições de inverno rigoroso, toda parte aérea perece, porém, as plantas tornam a rebrotar na primavera a partir da base do caule (ANDOLFI *et al.*, 2006; MORAES *et al.*, 2013; PAL *et al.*, 2014).

Moraes *et al.* (2013) relataram que a base do caule de estévia localiza-se sob o solo e resiste à temperatura do ar inferior a 0 °C, o que pode ser uma estratégia para tolerância ao frio, pois é necessário temperatura do ar muito baixa para o congelamento do solo. Os mesmos autores encontraram sobrevivência de 100% das plantas após o inverno em experimento localizado em Mississippi, Estados Unidos da América (EUA).

Em condições naturais, a espécie encontra-se em solos levemente alagados, com alto teor de matéria orgânica (SHOCK, 1982).

É uma planta de dia curto. Reduz o crescimento vegetativo e floresce entre o final do verão e início do outono em resposta à diminuição do fotoperíodo abaixo de 13 horas (KINGHORN, 2003).

As flores possuem autoincompatibilidade e necessitam de polinização entomófila para formação de frutos. As sementes polinizadas possuem a aparência escura e são mais pesadas, enquanto as inférteis são mais claras e leves. A dispersão das sementes se dá pelo vento (GOETTEMÖLLER e CHING, 1999).

A fenologia de estévia varia conforme as condições climáticas por ser bastante responsiva ao fotoperíodo (MADAN *et al.*, 2010; CEUNEN e GEUNS, 2013). Bonilla *et al.* (2007) avaliaram os estádios de desenvolvimento em estévia para determinação da fenologia da espécie e encontraram, para as condições da Colômbia, ciclo de 201 dias, sendo 54 dias de crescimento vegetativo (Tabela 1).

As funções ecológicas das substâncias adoçantes em estévia ainda não são conhecidas e especula-se que possam ter efeito repelente ou que envolvam um mecanismo de controle dos níveis de ácido giberélico, já que possuem a mesma rota metabólica (YADAV *et al.*, 2011).

Tabela 1 - Estádios fenológicos de *Stevia rebaudiana*. Bogotá, Colômbia.

Estádio de desenvolvimento	Dias após o Plantio	Duração do período
Emergência das plântulas	6	11
Crescimento vegetativo	17	54
Início do florescimento	71	44
Frutificação	115	54
Senescência	169	32
Rebrote	201	-

(BONILLA *et al.*, 2007)

2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

As folhas de estêvia possuem grandes quantidades de substâncias adoçantes (edulcorantes). São glicosídeos diterpênicos 30 a 450 vezes mais doces que a sacarose. A via de síntese destes compostos é a mesma do ácido giberélico, a partir do ácido mevalônico (MONDAÇA *et al.*, 2012).

Os edulcorantes mais importantes são rebaudiosídeo A (RA) e esteviosídeo (EST), porém já foram relatados: rebaudiosídeo B, rebaudiosídeo C, rebaudiosídeo D, rebaudiosídeo E, rebaudiosídeo F, dulcosídeo A, dulcosídeo C e esteviobiosídeo (YADAV *et al.*, 2011).

O EST é 300 vezes mais doce que a sacarose, porém, não é solúvel em água e possui gosto residual amargo chamado alcaçuz. O RA é 450 vezes mais doce que a sacarose, é solúvel em água e não possui sabor amargo residual (GOTO e CLEMENTE, 1998).

A relação entre RA e EST (R/E) é determinante para indústria. Este valor é calculado pela divisão do teor de RA pelo teor de EST (CARDELLO *et al.*, 2000). Quando a R/E aproxima-se ou ultrapassa 1, o sabor amargo residual do EST desaparece e a mistura torna-se solúvel em água, o que permite a composição de adoçantes líquidos comerciais (CARDELLO *et al.*, 2000; MOTA *et al.*, 2011; YADAV *et al.*, 2011).

EST e RA são termoestáveis até temperatura de 198 °C (GOTO e CLEMENTE, 1998). Os teores de EST e RA são determinados, em geral, por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (KOLB *et al.*, 2001).

As folhas e flores de estêvia possuem óleo essencial. Os principais constituintes são mono e sesquiterpenos. Mais de 60 compostos já foram encontrados e, em geral, não há composto majoritário. Os principais são α -cadinol (2,98%), espatulenol (2,21%), óxido de cariofileno (1,23%) e β -guaieno (0,32%) (HOSSAIN *et al.*, 2010; SIDDIQUE *et al.*, 2012).

As folhas de estêvia contêm, ainda, ácido fólico, vitamina C e todos os aminoácidos indispensáveis com exceção do triptofano (MONDAÇA *et al.*, 2012).

O caule de estêvia possui baixos teores de EST e RA e, assim, baixo valor comercial. Porém, apresenta intensificadores de sabor e aroma que podem ser utilizados na indústria de alimentos e bebidas (SINGH e RAO, 2005).

2.4 MORFOFISIOLOGIA

Durante o desenvolvimento inicial, a estêvia prioriza os fotoassimilados para produção de folhas (Figura 2b e c). Ao longo do cultivo, tende a aumentar a proporção de produção de caule. No período reprodutivo, concentra a destinação dos fotoassimilados para as flores e frutos. No final do ciclo anual de desenvolvimento, prioriza a produção de raízes (LIMA FILHO, 2004).

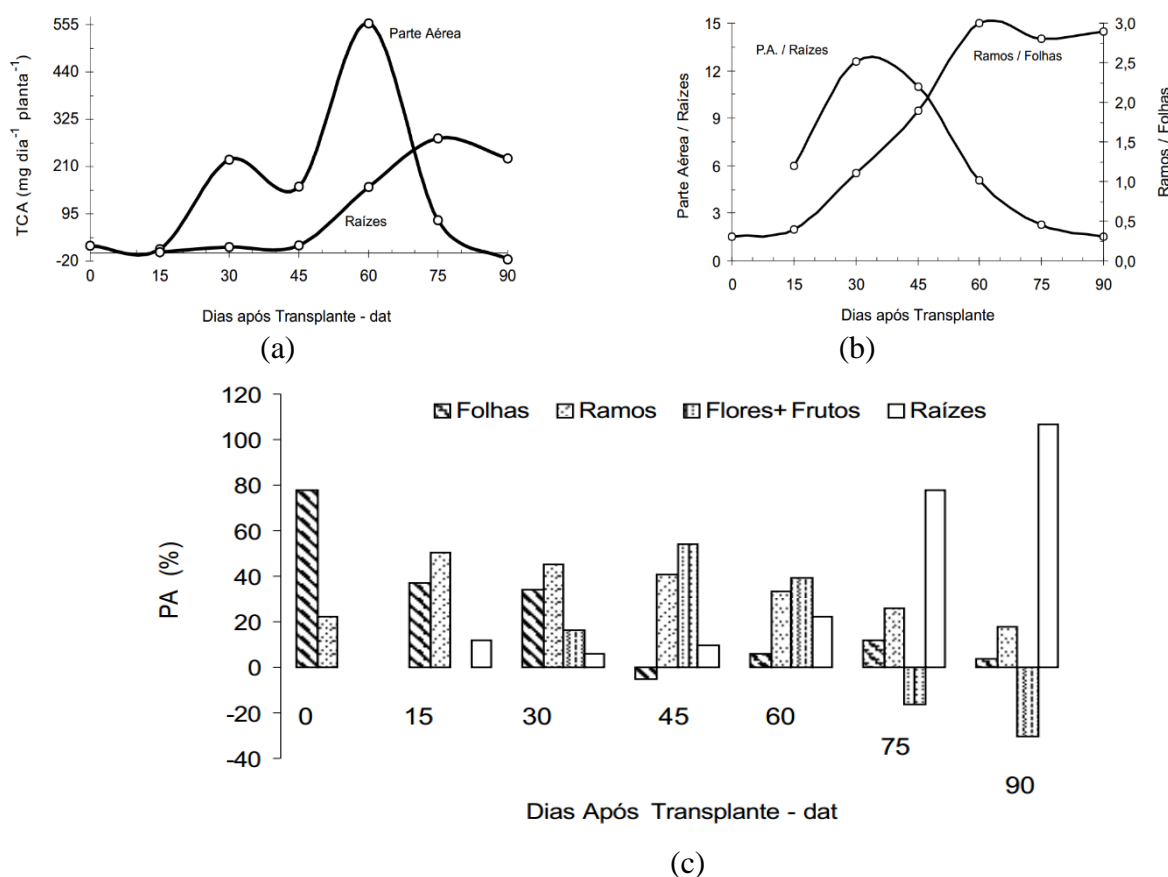


Figura 2 - Taxa de crescimento absoluto da parte aérea e raízes (a), relação entre parte aérea e raiz, relação entre massa seca de folhas e de ramos (b) e distribuição dos assimilados durante o desenvolvimento da cultura (c) de *Stevia rebaudiana* (LIMA FILHO, 2004).

Estes aspectos são especialmente importantes para determinação do manejo e colheita da cultura. A máxima Taxa de Crescimento Absoluto (TCA) da parte aérea pode ser indicativa da melhor época de colheita para produção de biomassa (Figura 2a) (LIMA FILHO, 2004).

Porém, é necessário associar a produtividade de biomassa aos teores de EST e RA e R/E para determinação do ponto ótimo de colheita, com vistas à máxima produtividade de EST e RA com padrão de R/E desejado (RAMESH *et al*, 2006).

Acessos de estévia apresentam perfis morfológicos bastante distintos. Alguns apresentam apenas uma haste por planta, enquanto outros exibem grande ramificação e várias hastes dominantes por planta (TATEO *et al.*, 1998).

Abdullateef e Osman (2011), em avaliação de acessos de estévia sob as mesmas condições de cultivo, encontraram grande variação morfológica com 4 a 11 hastes, 1,8 a 3,5 cm de circunferência do caule, 50 a 290 folhas, 6,1 a 14,46 cm de comprimento de folha.

Tateo *et al.* (1998) descreveram quatro perfis morfológicos para 13 acessos de estévia baseados, principalmente, no nível de ramificação das plantas e obtiveram alta correlação destes perfis com teor de EST.

O índice de área foliar (IAF) da cultura pode variar conforme manejo, espaçamento e o material genético utilizado, e apresenta crescimento linear até o florescimento, quando tende a reduzir (LIMA FILHO, 2004). Fronza e Folegatti (2003) encontraram IAF médio de 4,83.

Segundo Shyu *et al.* (1994), há grande variabilidade genética na espécie para espessura de folha e alta correlação deste caractere com o teor de edulcorantes.

As folhas de estévia apresentam tricomas tectores por todo limbo, de dois padrões de tamanho, 2,5 μm e 4,5 μm , e tricomas glandulares na parte adaxial e abaxial (SHAFFERT e CHEBOTAR, 1994).

Bondarev *et al.* (2003, 2010) sugerem que os glicosídeos diterpênicos em estévia são produzidos em tricomas glandulares, pela alta correlação encontrada entre o teor destes compostos e a densidade de tricomas.

As folhas apicais possuem maior densidade de tricomas glandulares (BONDAREV *et al.*, 2003; 2010). Ceunen e Geuns (2013) localizaram maiores teores de EST e RA, assim como R/E, nas partes superiores das plantas, nas folhas mais novas.

Guleria e Yadav (2011) encontraram nas folhas novas de estévia maior expressão dos microRNAs miR169, miR319 e miR164 que podem estar relacionados com a expressão dos genes responsáveis pela síntese de EST e RA na fase de pós transcrição.

2.5 ASPECTOS AGRONÔMICOS

O plantio de estêvia é realizado na primavera com mudas provenientes de semente, estaquia ou micropropagação (LIMA FILHO *et al.*, 2004).

Utilizam-se estandes entre 80.000 e 100.000 plantas ha⁻¹, em geral, com espaçamentos de 20 a 25 cm entre plantas e 50 cm entre linhas (PAL *et al.*, 2013; SERFATY *et al.*, 2013).

Há possibilidade de cultivo consorciado com trigo, cevada e canola, com espaçamentos maiores, como 45 cm entre plantas e 60 cm entre linhas, e deve-se dar preferência ao consórcio com plantas de desenvolvimento inicial lento para evitar competição por luz (RAMESH *et al.*, 2007).

A estêvia pode ser cultivada como espécie perene. Segundo Andolfi *et al.* (2006), a estêvia apresenta menor produtividade de massa seca de folhas (MSF) no primeiro ano e ao quinto ano apresenta auge de produtividade de MSF, sendo viável o cultivo até o sétimo ano.

A duração da cultura estabelecida a campo depende do material genético utilizado. No Brasil, em geral, as lavouras são replantadas após cinco anos de cultivo, devido à redução da produtividade (LIMA FILHO *et al.*, 2004).

Há poucos cultivares de estêvia no mundo. As principais características abordadas em programas de melhoramento genético são teor de RA e R/E, pois as cultivares crioulas e os acessos selvagens, em geral, apresentam baixo teor de RA e R/E abaixo de 0,3, o que os caracteriza como de baixo valor comercial (YADAV *et al.*, 2011).

No Brasil há apenas dois cultivares desenvolvidas. O Núcleo de Estudos em Produtos Naturais da Universidade Estadual de Maringá lançou em 2000 a cultivar UEM-320, com R/E entre 1,05 e 1,15 (DACOME *et al.*, 2005). Em 2012, a Universidade Estadual de Campinas registrou o cultivar CPQBA T6 (BRASIL, 2015).

ANAMI (2008), em avaliação de lavoura comercial composta por cultivar crioula, no município de Jandaia do Sul, Paraná, encontrou clones com R/E entre 0,03 e 1,59, e teor de RA entre 0,46 e 12,23%, o que expõe a diversidade e o potencial genético da espécie.

Há algumas cultivares de estêvia com R/E igual ou acima de 1 já desenvolvidos na China, Coreia, Taiwan, Indonésia, Rússia e Índia. A cultivar japonesa sob patente 61-202667 possui R/E de 2,56 (YADAV *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos por distintos trabalhos científicos apontam grande variação na produtividade de MSF, nos teores de EST e RA e na R/E (Tabela 2).

Por ser uma espécie de ocorrência em áreas parcialmente alagadas, possui alta exigência hídrica (SHOCK, 1982; LAVINI *et al.*, 2008). Aladakatti *et al.* (2012)

determinaram a evapotranspiração (ETP) para cultura de estêvia em Karnataka, Índia, como 1903,8 mm anuais, exibindo maior produtividade quando fornecido 120% da ETP, em torno de 2280 mm por ano.

Tabela 2 - Produtividade de MSF, teores de EST e RA e R/E em *Stevia rebaudiana* relatados na bibliografia científica.

Local	Ano de cultivo	MSF kg ha ⁻¹	EST %	RA %	R/E -	EST kg ha ⁻¹	RA kg ha ⁻¹	Referência
Pisa, Itália	1°	4369	-	-	-	-	-	Fronza e Folegatti, 2003
Maringá, Brasil	1°	4000	-	-	-	-	-	Lima Filho <i>et al.</i> , 2004
Palampur, Índia	1°	1631	8,0	-	-	130,5	-	Mejegi <i>et al.</i> , 2005
Pisa, Itália	1°	3375	-	-	-	-	-	Andolfi <i>et al.</i> , 2006
Pisa, Itália	6°	6100	-	-	-	-	-	Andolfi <i>et al.</i> , 2006
Campinas, Brasil	1°	-	4,4	-	-	-	-	Portugal <i>et al.</i> , 2006
Havana, Cuba	1°	1656	-	-	-	-	-	González <i>et al.</i> , 2007
Nápoles, Itália	1°	4600	8,4	5,7	0,68	384,6	263,1	Lavini <i>et al.</i> , 2008
Palampur, Índia	1°	1679	9,5	3,7	0,39	159,5	61,6	Pal <i>et al.</i> , 2013
Ramat, Israel	1°	3000	11,2	-	-	335,1	-	Serfaty <i>et al.</i> 2013
Mississippi, EUA	3°	6948	7,5	5,6	0,75	521,8	390,5	Moraes <i>et al.</i> , 2013
Palampur, Índia	1°	1590	8,0	3,0	0,38	127,2	47,7	Pal <i>et al.</i> , 2014

Fronza e Folegatti (2003) em avaliação da ETP no cultivo de estêvia em Pisa, Itália, determinaram o coeficiente da cultura como 1,45 para os primeiros 25 dias de cultivo, 1,14 para os 25 dias posteriores e 1,16 para os 30 dias finais do ciclo. Os mesmos autores relataram ETP média ao longo do ciclo de produção de 5,8 mm dia⁻¹, similar ao encontrado por Aladakatti *et al.* (2012).

A utilização de fungos micorrízicos arbusculares para estêvia apresenta-se como técnica promissora de incremento de rendimento. Portugal *et al.* (2006) obtiveram, com o fungo IAC43, 4,5 vezes maior produtividade de EST por planta, resultado do aumento da quantidade de MSF e do teor de EST.

Mandal *et al.* (2013) mostraram maior produtividade de EST e RA em plantas inoculadas com micorrizas arbusculares, provocado pela maior disponibilidade de nutrientes às plantas e por fatores não nutricionais associados a sinais hormonais via ácido jasmônico.

Das *et al.* (2007) relataram o incremento em produtividade de MSF em 44,4% com uso de biofertilizante composto por micorriza arbuscular vesicular, bactéria solubilizadora de fósforo e *azospirillum*.

O manejo de poda do ápice das mudas no momento do plantio é essencial para adequada ramificação e produtividade da cultura (LIMA FILHO *et al.*, 2004). Pal *et al.*

(2013) relataram aumento de produtividade de MSF em 17% com a prática de poda da parte apical das mudas na implantação da cultura a campo.

Quando as plantas iniciam florescimento há tendência dos fotoassimilados serem translocados para as flores e frutos, o que reduz a produtividade de MSF e, desta forma, o florescimento deve ser evitado o máximo possível (LIMA FILHO, 2004).

O comprimento do dia é fator estimulante para produtividade de MSF e aumento dos teores de EST e RA em estêvia (RAMESH *et al.*, 2006; MADAN *et al.*, 2010; CEUNEN e GEUNS, 2013). Fotoperíodo elevado, acima de 13 h, induz o atraso no florescimento e resulta no alongamento do ciclo de cultivo e acúmulo de edulcorantes (CEUNEN *et al.*, 2011).

Ceunen *et al.* (2011) relataram que o fornecimento de cinco minutos de luz vermelha à noite para plantas de estêvia é suficiente para conversão de fitocromo R em fitocromo F e o atraso do florescimento, o que ocasiona aumento do teor de edulcorantes. Os mesmos autores mostraram ser possível a utilização desta técnica a campo em cultivos comerciais.

A parte de maior interesse na estêvia é a folha, onde se concentram os compostos adoçantes. Porém, no cultivo comercial, toda parte aérea é colhida a 5 cm do solo, seca e levada à indústria para extração de EST e RA (LIMA FILHO *et al.*, 2004).

A dinâmica de colheitas ao longo do ano varia de acordo com as condições edafoclimáticas. Em clima quente e chuvoso, a estêvia cresce durante todo o ano e podem-se realizar três a quatro colheitas, enquanto aonde há invernos rigorosos ou seca, uma a duas colheitas resultam em maior produtividade de MSF, EST e RA (MORAES *et al.*, 2013; SERFATY *et al.*, 2013; PAL *et al.*, 2014).

Segundo Periche *et al.* (2015) a secagem aumenta a capacidade antioxidante e reduz o teor de EST em estêvia. Os mesmos autores determinaram 180 °C por 3 min como o melhor método de secagem para rendimento de antioxidantes, enquanto para EST a secagem deve ser a 100 °C por 3 min ou a sombra em temperatura ambiente. Lima Filho *et al.* (2004) recomendaram secagem ao sol por 6 h, até as folhas atingirem 10 a 12% de umidade ou em secador de circulação de ar forçado a 65 °C.

2.6 ASPECTOS ECONÔMICOS

A estêvia é cultivada principalmente na China, que detém 80% da produção mundial. A produção global de estêvia deve chegar, em 2015, entre 8 a US\$ 11 bilhões (INDUSTRYARC, 2014).

Na década de 90 o *Food and Drug Administration* (FDA) proibiu o uso de estévia nos EUA por considerar não haver estudos suficientes sobre a segurança do consumo da planta. A União Europeia (UE) também proibiu a comercialização de estévia, o que acarretou a concentração da produção e consumo da planta na Ásia (SAAD *et al.*, 2014).

Em 2006 a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) e a *World Health Organization* (WHO) anunciaram um consumo diário seguro de estévia. Em 2008 o FDA autorizou o uso de estévia como extrato purificado de RA nos EUA e, no ano seguinte, a França aprovou o uso (SAAD *et al.*, 2014). A UE veio a liberar a comercialização de estévia em 2010 (EFSA, 2010).

A liberação do uso de estévia nos EUA e UE promoveu expressivo aumento da demanda mundial pela planta. Grandes empresas como Pepsi e Coca-Cola já possuem linhas de produtos adoçados com estévia (SAAD *et al.*, 2014). Com a abertura dos maiores mercados mundiais para a comercialização de estévia, o cultivo desta espécie deve apresentar crescimento exponencial nos próximos anos (INDUSTRYARC, 2014).

O Brasil não possui produção suficiente para atender a demanda do mercado interno, o que resulta na necessidade de importação. No ano de 2013, o país exportou US\$ 2,7 milhões e importou mais de US\$ 8 milhões em estévia (Figura 3) (BRASIL, 2014).

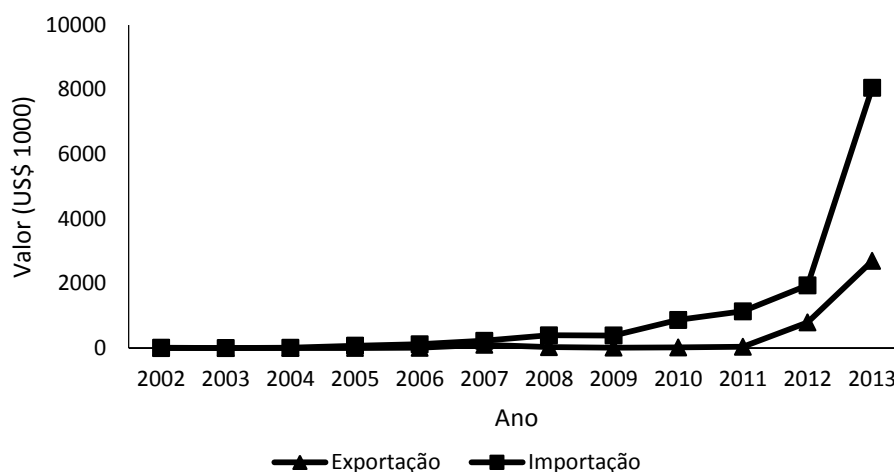


Figura 3 - Evolução das exportações e importações de *Stevia rebaudiana* no Brasil (BRASIL, 2014).

Segundo Correia Junior *et al.* (2004), em 2001 a estévia era uma das principais espécies medicinais e condimentares cultivadas no estado do Paraná, com 10 ha plantados e valor bruto da produção de R\$ 32.826,00.

Em 2011, com o avanço do cultivo de estévia no Brasil, a empresa Steviafarma, maior produtora de estévia no país, alcançou 200 ha plantados no estado do Paraná, e preço de venda de edulcorante de estévia entre 65 a R\$ 330,00 kg⁻¹ (CAETANO, 2011).

3 ACÚMULO DE BIOMASSA E PRODUÇÃO DE ESTEVIOSÍDEO E REBAUDIOSÍDEO A EM ACESSOS DE *Stevia rebaudiana* Bert.

RESUMO

A estévia (*Stevia rebaudiana* Bert.) é uma planta da família Asteraceae, nativa do Brasil e Paraguai utilizada como adoçante natural. Suas folhas produzem esteviosídeo (EST) e rebaudiosídeo A (RA) que são, respectivamente, 300 e 450 vezes mais doces que a sacarose e não apresentam poder calórico. No Brasil o cultivo de estévia é, ainda, incipiente e não há produção suficiente para atender a demanda do mercado interno. Dentre as dificuldades para o desenvolvimento do cultivo no país está a carência de materiais genéticos adaptados às condições edafoclimáticas das regiões produtoras. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial produtivo de sete acessos de estévia na região metropolitana de Curitiba, PR, Brasil. O experimento foi implantado na última semana de outubro de 2013 com espaçamento 25x50 cm, resultando em população de 80.000 plantas ha⁻¹. A produtividade de MSF, teores de EST e RA, relação RA/EST e produtividade de EST e RA foram avaliados. Os acessos 6, 7 e 14 apresentam padrão industrial com relação RA/EST próxima ou superior a 1 e produtividade de até 558.5 kg ha⁻¹ de EST e 553.1 kg ha⁻¹ de RA.

Palavras-chave: adoçante, diabetes, edulcorante, produtividade.

BIOMASS ACCUMULATION AND STEVIOSIDE AND REBAUDIOSIDE A PRODUCTION IN *Stevia rebaudiana* Bert. ACCESSIONS

ABSTRACT

Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) is an Asteraceae plant family, native to Brazil and Paraguay and used as a natural sweetener. It produces stevioside (ST) and rebaudioside A (RA), which are respectively 300 and 450 times sweeter than sucrose and have non-caloric value. In Brazil stevia cultivation are weak and there is no production enough to meet demands for the internal market. Among the difficulties for the development of the crop in Brazil is the lack of genetic materials adapted to each environmental condition of the production regions. This study aimed to evaluate the potential in production of seven stevia accessions in the metropolitan region of Curitiba, Paraná, Brazil. The experiment establishment was in the last week of October 2013 with spacing of 25x50 cm and population of 80,000 plants ha⁻¹. The yield of leaf dry weight, EST and RA contents, RA/EST ratio and EST and RA yield were evaluated. The accessions 6, 7 and 14 have industry standard with the RA/EST ratio near to 1 and yield of 558,5 kg ha⁻¹ of EST and 553,1 kg ha⁻¹ of RA.

Keywords: sweetener, diabetes, yield.

3.1 INTRODUÇÃO

A estévia, *Stevia rebaudiana* Bert., é uma espécie da família Asteraceae utilizada como adoçante natural. Suas folhas possuem altos teores de esteviosídeo (EST) e rebaudiosídeo A (RA) que são respectivamente 300 a 450 vezes mais doces que a sacarose e não apresentam poder calórico (MONDAÇA *et al.*, 2012).

A demanda mundial pela planta cresce e deve alcançar entre 8 e 11 bilhões de dólares em 2015 (INDUSTRYARC, 2014). O cultivo e consumo de estévia concentram-se na China e Japão, porém, com a permissão da comercialização nos mercados norte-americano em 2008 e europeu em 2010, o cultivo de estévia expande-se para diversas regiões do mundo (SAAD *et al.*, 2014).

No Brasil o cultivo de estévia é incipiente e não há produção suficiente para suprir a demanda do mercado interno, que cresce. O país importou mais de US\$ 8 milhões e exportou US\$ 2,7 milhões em estévia em 2013 (BRASIL, 2014).

O aumento de produção necessário para atender à crescente demanda por estévia depende, dentre outros aspectos agrônômicos, do desenvolvimento de cultivares produtivos e adaptados às condições edafoclimáticas das regiões produtoras (YADAV *et al.*, 2011).

Os componentes de rendimento em estévia compreendem a produtividade de massa seca de folhas (MSF), os teores de EST e RA e a relação RA/EST (R/E) (RAMESH *et al.*, 2006). Os programas de melhoramento genético dão enfoque ao teor de RA e à R/E (YADAV *et al.*, 2011).

Segundo Cardello *et al.* (2000), o EST apresenta sabor amargo e é insolúvel em água, enquanto o RA não apresenta estas características e quando a relação R/E aproxima-se de 1, o cristal purificado de estévia torna-se solúvel e sem sabor amargo residual.

Os acessos selvagens ou oriundos de lavouras comerciais podem apresentar muita variabilidade genética (Shyu *et al.*, 1994). Anami (2008) encontrou, em clones selecionados de uma lavoura comercial em Jandaia do Sul, Paraná, teor de RA entre 0,46 e 12,23% e R/E entre 0,03 e 1,59. Sendo assim, a avaliação de materiais genéticos selvagens ou cultivados pode resultar na obtenção de clones com perfil químico de interesse para cultivo e melhoramento genético.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial produtivo de sete acessos de estévia na região metropolitana de Curitiba.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Características Edafoclimáticas do Experimento

O ensaio foi conduzido em condições de campo no Centro de Estações Experimentais do Canguiri (CEEx – Universidade Federal do Paraná), município de Pinhais, PR, nas coordenadas 25°38'58'' S, 49°12'59'' W, a 916 m de altitude.

O clima da região é classificado como Cfb de Köppen, subtropical super úmido, mesotérmico com verões frescos e geadas severas demasiadamente frequentes, sem estação seca definida. Os dados climáticos da ocasião do experimento estão dispostos na Tabela 3, divididos em dois períodos e a relação entre estes.

Tabela 3 - Condições climáticas durante o experimento. Pinhais, 2013/2014.

Condições Climáticas	1º Período					2º Período				Relação %
	Nov	Dez	Jan	Fev	Média	Mar	Abr	Mai	Média	
Precipitação (mm)	105,6	103,8	198,6	135,2	135,8	121,2	68,4	88,0	92,5	-31,9
Temperatura máxima (°C)	23,7	26,2	28,7	28,1	26,7	25,2	22,6	20,7	22,8	-14,4
Temperatura mínima (°C)	14,2	16,2	17,4	17,3	16,3	16,1	14,5	11,8	14,1	-13,0
Temperatura média (°C)	18,0	20,1	21,8	21,6	20,4	19,7	17,6	15,3	17,5	-14,0
Radiação Solar W m ⁻²	352,0	395,0	446,0	397,8	397,7	324,2	259,2	250,1	277,8	-30,1
Umidade relativa do Ar (%)	87,1	85,0	83,1	83,4	84,7	87,8	90,5	88,7	89,0	5,1
Fotoperíodo (h)	13,3	13,6	13,4	12,9	13,3	12,2	11,4	10,7	11,4	-14,0

Fonte: SIMEPAR, 2014

O solo em análise química e física prévia apresentou pH SMP= 5,2; Al⁺³= 0,0 cmol_c dm⁻³; H⁺+Al⁺³= 5,8 cmol_c dm⁻³; Ca⁺²= 6,1 cmol_cdm⁻³; Mg⁺²= 3,1 e K⁺= 0,88 cmol_c dm⁻³; P= 35,4 mg dm⁻³; C= 26,3 g dm⁻³; saturação de bases 63% e teor de argila 400 g kg⁻¹.

Para correção do solo, segundo ROLAS (2009), aplicou-se 4,5 t ha⁻¹ de calcário (Filler, PRNT 95%) para elevar o pH a 6. Foi realizado duas aragens a 30 cm de profundidade e uma gradagem superficial para preparo do solo.

3.2.2 Material Vegetal

Os acessos denominados 4, 6, 7, 8, 9, 12 e 14 foram fornecidos *in vitro* pela EMBRAPA CENARGEN Brasília, e multiplicados a cada 15 dias no Laboratório de

Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Utilizou-se meio Murashige e Skoong modificado com 20 g L⁻¹ de sacarose, em sala climatizada com fotoperíodo de 16 h fornecido por lâmpada fluorescente branca fria do tipo luz do dia com densidade de fluxo de fótons de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e temperatura de 25±2 °C.

As mudas com 3 pares de folhas foram transplantadas para tubetes de 195 cm³ preenchidos com 2/3 de vermiculita de granulometria fina, e 1/3 de Plantmax HT®, acondicionadas para aclimatização por 14 dias em nebulização intermitente de 5 s de irrigação a cada 30 min e desenvolvidas por 20 dias em cultivo protegido com rega manual diária. Ao final deste período, foram selecionadas as mudas com 35 a 40 cm de altura e cinco a seis pares de folhas.

3.2.3 Condução do Experimento

A implantação do experimento a campo foi realizada entre os dias 25 e 27 de outubro de 2013 com espaçamento de 25 cm entre plantas e 50 cm entre linhas, população de 80.000 plantas ha⁻¹. Cada parcela foi formada por 25 plantas, com cinco plantas na linha e cinco linhas. Foram desconsideradas as plantas da bordadura, sendo plantas úteis apenas as nove centrais. As mudas foram podadas a 20 cm do solo, permanecendo três pares de folhas. Foram aplicados 39,6 kg ha⁻¹ de nitrogênio em cobertura em duas parcelas de 44 kg ha⁻¹ de uréia realizadas no plantio e 25 dias após o plantio (DAP), segundo recomendação de ROLAS (2009).

Nos primeiros 10 DAP foi realizada irrigação quando necessário. Durante todo o experimento foram feitas capinas semanais controle das plantas daninhas. Aplicou-se calda de *Nicotiana tabacum* L. em concentração de 3% e vazão de 400 L ha⁻¹ para prevenção do ataque de pragas aos 8 DAP.

3.2.4 Avaliação do Experimento

O procedimento de colheita seguiu recomendação de Lima Filho *et al.* (2004), quando as plantas apresentavam-se com 5% de flores abertas, o que ocorreu entre os dias 18 e 27 de fevereiro de 2014 para os acessos 4 (117 DAP), 6 (123 DAP), 7 (119 DAP), 8 (121 DAP), 9 (114 DAP), 12 (116 DAP) e 14 (119 DAP).

As 9 plantas úteis de cada parcela foram cortadas a 5 cm do solo. As folhas foram separadas do caule manualmente, pesadas para determinação de massa fresca e armazenadas em sacos de papel multifoliado kraft[®]. O material permaneceu em secador com circulação de ar forçado a 65 °C por 48 horas e foi novamente pesado para determinação da massa seca de folhas (MSF).

Um segundo período de produção foi avaliado para determinar o potencial de realização de uma segunda colheita no clima deste experimento. A segunda colheita foi realizada 86 dias após a primeira colheita, antes da ocorrência de geadas. Seguiu-se o mesmo procedimento metodológico da primeira colheita.

3.2.5 Análise dos Teores de EST e RA

As análises dos teores de EST e RA foram realizadas no Grupo de Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica do Departamento de Farmácia da Universidade do Sul de Santa Catarina utilizando metodologia adaptada da desenvolvida por Kolb et al. (2001).

As amostras foram compostas de 1 g de folhas secas moídas em aparelho liquidificador pesadas em balança de precisão Marte[®] modelo AY220. A extração deu-se com a adição do solvente etanol a 70% a temperatura de 70°C em agitação por 30 min em agitador FAALK[®] a 50% e posterior filtragem em filtro de papel.

O extrato foi injetado em aparelho HPLC Shimadzu[®] (SPD-10A, CTO-10A, CBM-10A e LC-10^a), coluna NH2 (250 x 4,6 mm), fase móvel composta por acetonitrila e água ultrafiltrada (80:20), fluxo de 2 mL min⁻¹, temperatura 30°C, pressão máxima 300, pressão da bomba 86 bar e detecção com leitor UV a 210 nm (0,04 AUFS).

A quantificação foi realizada por meio de curvas de calibração criadas por distintas concentrações de padrão analítico de esteviosídeo e rebaudiosídeo A Sigma[®] (Figura 4).

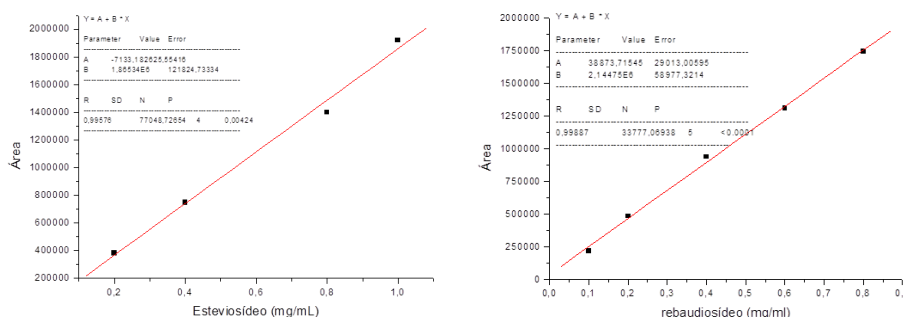


Figura 4 - Curvas de calibração com cinco concentrações de padrão de esteviosídeo e rebaudiosídeo A Sigma[®].

Foram determinados teores de EST e RA e relação entre RA e EST (R/E) para cada colheita e a média ponderada pela produtividade de MSF para os teores totais da safra. Também foi calculado a soma de RA e EST (SRE) e produtividade de EST e RA para cada colheita.

3.2.6 Agrupamento Químico

Foi realizado o agrupamento dos acessos de estévia em dendrograma pelo perfil químico com base no coeficiente de Jaccard pelo método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging* (UPGMA) no programa STATISTICA®.

Os grupos químicos foram divididos de acordo com a média das maiores distâncias, considerando a média do maior salto (0,032) como ponto de corte no dendrograma.

A análise *Principal Component Analysis* (PCA) foi realizada com auxílio do mesmo programa para determinação da dispersão dos acessos com base no perfil químico, assim como a determinação dos principais parâmetros que distinguem os grupos químicos formados.

3.2.7 Delineamento Experimental e Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema de parcelas subdivididas com cinco repetições. Os tratamentos das parcelas foram sete acessos de estévia enquanto nas sub-parcelas foram duas colheitas.

Os dados foram testados quanto à homogeneidade pelo teste de Bartlett. Realizou-se análise de variância ANOVA com o programa ASSISTAT® (SILVA e AZEVEDO, 2009) e teste de separação de médias Tukey a 1% de probabilidade de erro.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Acúmulo de Biomassa

Na primeira colheita, o acesso 4 apresentou maior produtividade de MSF, seguido pelo acesso 9 e posteriormente o acesso 12. Na segunda colheita, o acesso 4 novamente apresentou maior produtividade de MSF, seguido do acesso 12. Como consequência, o acesso 4 apresentou maior produtividade de MSF total, seguido pelos acessos 9 e 12. (Tabela 4).

Tabela 4 - Produtividade de MSF de acessos de *Stevia rebaudiana*. Pinhais, 2014.

Acesso	1º Colheita		2º Colheita		Total	
	kg ha ⁻¹		kg ha ⁻¹		kg ha ⁻¹	
4	4253,2	A a	1334,0	B a	5587,3	a
6	3255,1	A d	753,2	B cd	4008,3	c
7	3247,5	A d	832,5	B c	4080,0	c
8	2818,8	A f	768,4	B cd	3587,2	e
9	4031,8	A b	652,9	B d	4684,6	b
12	3733,1	A c	1033,8	B b	4766,9	b
14	3090,9	A e	698,3	B cd	3789,2	d
Média	3490,1		867,6		4357,6	
CV (%)	3,58		4,24			

Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey $p < 0,01$.

As produtividades de MSF total dos acessos 4, 9 e 12 foram superiores ao encontrado por Andolfi *et al.* (2006), Fronza e Folegatti (2003), González *et al.* (2007), Lima Filho *et al.* (2004), Mejegi *et al.*, (2005), Pal *et al.*, (2014), Pal *et al.* (2013) e Serfaty *et al.* (2013), e para o primeiro ano do cultivo, cujos valores variaram entre 1590 e 4369 kg ha⁻¹.

Resultados superiores são relatados por Andolfi *et al.* (2006) de 6100 kg ha⁻¹ de MSF no quinto ano de cultivo e por Moraes *et al.* (2013) de 6948 kg ha⁻¹ de MSF no terceiro ano de cultivo.

A produtividade de MSF foi menor na segunda colheita para todos os acessos. Isto se deve, em parte, ao estresse ocasionado pela primeira colheita e ao menor período de desenvolvimento. Para a primeira colheita, o período foi de 114 dias enquanto para a segunda colheita foi de apenas 84 dias.

A estévia apresenta curva sigmoide de acúmulo de MSF e uma pequena redução no período de desenvolvimento de máxima produtividade pode afetar substancialmente a produtividade final da cultura (LIMA FILHO, 2004).

Além disso, as condições climáticas no segundo período foram menos favoráveis, pois houve redução média de 1,9 h no fotoperíodo, de 43,3 mm mês⁻¹ na precipitação, de 2,9 °C na temperatura média e de 119,9 W m⁻² na radiação solar (Tabela 3).

O comprimento do dia é fator estimulante para produtividade de MSF em estévia (RAMESH *et al.*, 2006; MADAN *et al.*, 2010; CEUNEN e GEUNS, 2013). Fotoperíodo acima de 13 h induz o alongamento do ciclo vegetativo, retarda o florescimento e possibilita maior acúmulo de MSF.

Com a redução do fotoperíodo, as plantas permaneceram floridas durante todo segundo período. Lima Filho (2004) analisou o crescimento de estévia e relatou que quando em florescimento e frutificação as plantas priorizam os fotoassimilados para as flores e frutos e reduzem, assim, o acúmulo de MSF.

A estévia demanda em torno de 255 mm mês⁻¹ durante o período de máximo desenvolvimento (FRONZA e FOLEGATTI, 2003; LAVINI et al., 2008; ALADAKATTI et al., 2012). Os dois períodos de desenvolvimento não apresentaram esta precipitação, porém a menor precipitação ocorrida no segundo período pode ter causado menor acúmulo de MSF.

Segundo Lima Filho *et al.* (2004), a estévia é originária de regiões quentes e desempenha-se melhor nestas condições. As maiores temperaturas e radiação solar no primeiro período podem ter proporcionado às plantas melhores condições fotossintéticas para maior produtividade de folhas.

Nas condições climáticas deste experimento, pode ser vantajoso antecipar a primeira colheita com vistas a disponibilizar maior período de produção e condições climáticas mais favoráveis para o desenvolvimento das plantas no segundo período produtivo.

3.3.2 Teor e Produtividade de EST E RA

Os teores de EST e RA variaram conforme o acesso e a colheita. O acesso 4 apresentou maior teor de EST na primeira colheita. Na segunda colheita, os acessos 4, 7 e 14 apresentaram os maiores teores de EST. No total o acesso 4 se destacou no teor de EST, porém apresentou baixo teor de RA, superior apenas ao acesso 12 (Tabela 5).

Tabela 5 - Teores de EST e RA na MSF de acessos de *Stevia rebaudiana*. Pinhais, 2014.

Acesso	EST			RA		
	1º Colheita	2º Colheita	Total	1º Colheita	2º Colheita	Total
	%	%	%	%	%	%
4	16,6 A a	12,9 B a	15,7 a	3,1 A e	2,1 B e	2,8 e
6	11,0 A e	6,8 B c	10,2 e	10,4 A b	6,3 B b	9,7 b
7	13,9 A bc	12,4 B a	13,5 b	14,0 A a	9,1 B a	13,0 a
8	14,9 A b	8,0 B c	13,4 b	7,4 A c	5,3 B c	6,9 c
9	12,0 A de	6,8 B c	11,2 d	6,0 A d	3,2 B d	5,6 d
12	14,2 A b	11,8 B a	13,7 b	2,4 A f	1,8 B e	2,3 f
14	12,8 A cd	10,2 B b	12,3 c	13,9 A a	8,7 B a	12,9 a
Média	13,6	9,8	12,9	8,2	5,2	7,6
CV (%)	4,28		3,39	3,7		3,45

Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey p<0,01.

Os acessos 4 e 12 apresentaram as menores R/E para as duas colheitas (Tabela 6). Este perfil químico está em desconformidade com o padrão exigido pela indústria, pois esta considera o RA o composto mais importante e adota como critério de qualidade a R/E próxima ou superior a 1 (GOTO e CLEMENTE, 1998; CARDELLO *et al.*, 2000; YADAV *et al.*, 2011; MOTA *et al.*, 2011).

Tabela 6 - R/E de acessos de *Stevia rebaudiana*. Pinhais, 2014.

Acesso	1º Colheita g g ⁻¹	2º Colheita g g ⁻¹	Total g g ⁻¹
4	0,19 A d	0,16 A d	0,18 d
6	0,95 A b	0,92 A a	0,95 b
7	1,01 A ab	0,73 B b	0,96 b
8	0,50 B c	0,66 A b	0,52 c
9	0,50 A c	0,47 A c	0,50 c
12	0,17 A d	0,16 A d	0,17 d
14	1,08 A a	0,86 B a	1,05 a
Média	0,63	0,57	0,62
CV (%)	6,95		4,56

Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey $p < 0,01$.

Os acessos 7 e 14 exibiram os maiores teores de RA nas duas colheitas, seguidos pelo acesso 6. O acesso 14 teve maior R/E total (1,05) seguido pelos acessos 6 e 7 (0,95 e 0,96) e apresentaram, assim, perfil químico conforme os padrões exigidos pela indústria.

Os teores de EST e RA foram menores na segunda colheita para todos os acessos. Este comportamento pode estar associado, da mesma forma que a redução observada na MSF, ao estresse ocasionado pela primeira colheita, às condições ambientais menos favoráveis e menor período de desenvolvimento.

O acesso 8 foi o único que apresentou aumento da R/E na segunda colheita em relação a primeira. Os acessos 7 e 14 apresentaram maior R/E na primeira colheita em relação a segunda e os demais não apresentaram diferença significativa.

Os acessos 7 e 14 apresentaram teores de EST e RA e R/E maiores que os relatados na bibliografia científica por Mejegi *et al.* (2005), Serfaty *et al.* (2013), Pal *et al.* (2013), Pal *et al.* (2014), Lavini *et al.* (2008) Moraes *et al.* (2013) cujos maiores valores foram 11,7% de EST e 5,72% de RA e 0,75 de R/E.

Há algumas cultivares de estévia com R/E igual ou superior a 1 já desenvolvidos na China, Coreia, Taiwan, Indonésia, Rússia e Índia. A cultivar japonesa sob patente 61-202667

possui R/E de 2,56 (YADAV *et al.*, 2011). No Brasil, a cultivar UEM-320 apresentou R/E entre 1,05 a 1,15 cultivada em Jandaia do Sul, Paraná (DACOME *et al.*, 2005).

A produtividade de EST e RA foi menor na segunda colheita para todos os acessos (Tabela 7), resultado do mesmo comportamento apresentado por MSF e teores de EST e RA.

Tabela 7 - Produtividade de EST e RA de acessos de *Stevia rebaudiana*. Pinhais, 2014.

Acesso	EST			RA		
	1° Colheita	2° Colheita	TOTAL	1° Colheita	2° Colheita	Total
	kg ha ⁻¹	kg ha ⁻¹	kg ha ⁻¹	kg ha ⁻¹	kg ha ⁻¹	kg ha ⁻¹
4	700,1 A a	177,2 B a	877,3 a	129,4 A f	28,4 B cd	157,8 e
6	355,2 A f	48,5 B d	403,7 f	339,8 A c	45,1 B b	382,9 c
7	455,9 A d	102,6 B bc	558,5 c	457,2 A a	75,9 B a	533,1 a
8	423,0 A de	65,4 B d	488,4 de	210,2 A e	42,3 B bc	252,5 d
9	482,8 A c	43,9 B d	526,7 cd	237,3 A d	20,8 B d	258,1 d
12	526,5 A b	166,4 B b	692,9 b	89,0 A g	18,1 B d	107,1 f
14	394,7 A e	73,8 B cd	468,4 e	426,7 A b	63,3 B a	490,0 b
Média	475,5	89,7	565,1	270,0	42,0	311,9
CV (%)	4,24		3,18	3,77		3,09

Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey $p < 0,01$.

O acesso 7 apresentou maior produtividade de RA total, seguido pelo acesso 14 e posteriormente o acesso 6 (Tabela 7), com produtividades de SRE total de, respectivamente, 1092, 958 e 787 kg ha⁻¹, superiores à produtividade de SRE de 503,6 kg ha⁻¹ encontrada por Pal *et al.* (2014).

3.3.3 Análise de Agrupamento Químico

A análise de agrupamento químico dos acessos demonstrou a existência de quatro grupos distintos, sendo que os acessos 4 e 12 estão no grupo 1, os acessos 8 e 9 no grupo 2 o acesso 6 no grupo 3 e os acessos 7 e 14 no grupo 4 (Figura 5).

O grupo 1 caracterizou-se pelo elevado teor de EST e baixo teor de RA. Os acessos deste grupo apresentaram alta produtividade de MSF, o que pode ser uma característica genética do grupo. Estes caracteres genéticos podem ser de interesse em programas de melhoramento para aumentar a produtividade de MSF ou para criar cultivar com alto teor de EST para um nicho de mercado como a indústria farmacêutica.

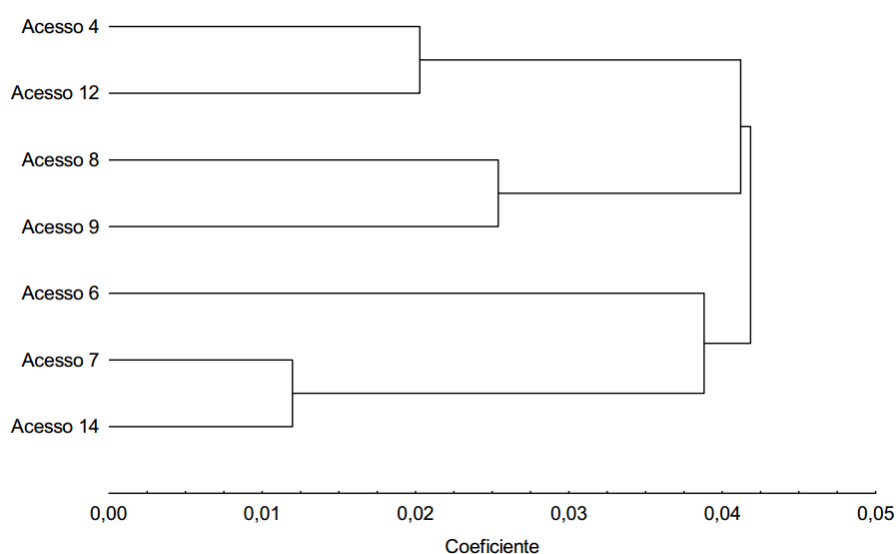


Figura 5 - Dendrograma de agrupamento químico com base nas distâncias Euclidianas de acessos de *Stevia rebaudiana*. Pinhais, 2014.

Os acessos 7 e 14, grupo 4, são muito similares pois apresentaram a menor distância Euclidiana e caracterizam-se pelos maiores teores de RA e pela elevada R/E.

O RA é responsável por 88,6% da diferença entre os grupos químicos, enquanto o EST varia pouco entre os acessos. A análise PCA agrupou os acessos com similaridade química da mesma forma que o dendrograma, confirmando a formação dos grupos (Figura 6). Os grupos 1 e 4 são os mais distantes da origem e explicam a diferença entre os grupos químicos formados. O estudo entre os grupos 1 e 4 pode elucidar as condições para elevado teor de RA e alta produtividade de MSF.

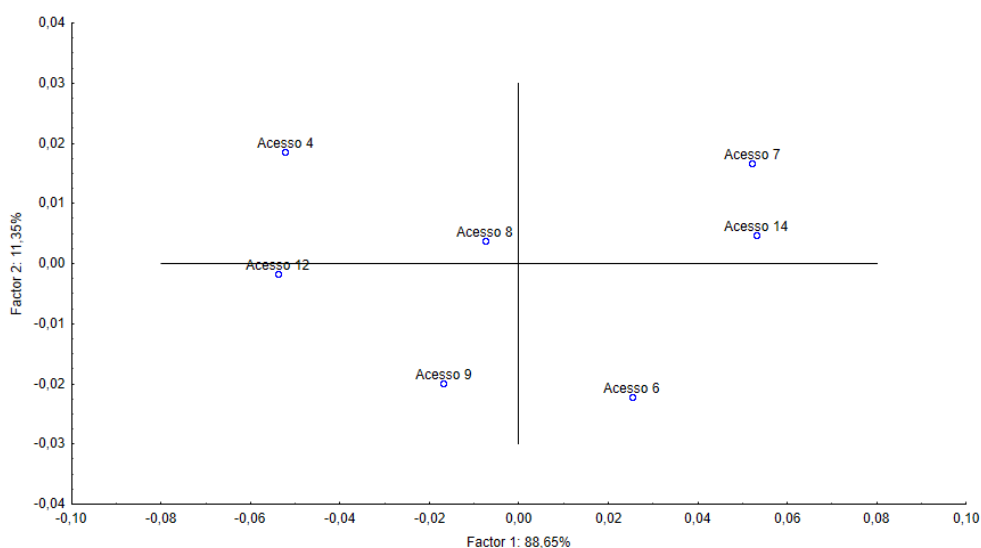


Figura 6 - *Principal Component Analysis* (PCA) com base nos teores de EST e RA de acessos de *Stevia rebaudiana*. Pinhais, 2014.

Houve correlação entre MSF com teor de RA (-0,71) e com produtividade de EST (0,79). Esta tendência pode ser avaliada para compreensão da relação entre os aspectos de maior interesse no cultivo da planta: MSF, RA e R/E.

3.4 CONCLUSÃO

Os acessos 6, 7 e 14 possuem perfil químico de interesse para indústria, com altos teores de EST e RA, alta R/E e alta produtividade de SRE e apresentam potencial para cultivo comercial e melhoramento genético.

REFÊRENCIAS

- ALADAKATTI, Y. R. *et al.* Effect of irrigation schedule and planting geometry on growth and yield of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). **Karnataka J. Agric. Sci.**, v. 25, n. 1, p. 30-35, 2012. DOI: 10.1080/03650340.2012.699676.
- ANAMI, R. T. **Caracterização e divergência genética em clones de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni**. 48 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2008
- ANDOLFI, L. *et al.* Agronomic productive Characteristics of Two Genotype of *Stevia rebaudiana* in Central Italy. **Ital. J. of Agron.**, v. 2, p. 257-262, 2006. DOI: 10.4081/ija.
- BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Secretaria do Comércio Exterior. **Programa AliceWeb**. 2014. Disponível em <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>>. Acessado em 26/10/2014.
- CARDELLO, H. M. A. D. *et al.* Análise descritiva quantitativa de edulcorantes em diferentes concentrações. **Food Sci. Technol.**, v. 20, n. 3, p. 318-328, 2000. DOI: 10.1590/S0101-20612000000300008.
- CEUNEN, S.; GEUNS, J. M. C. Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). **Plant Sci.**, v. 198. p. 72-82, 2013. DOI: 10.1016/j.plantsci.2012.10.003.
- CEUNEN, S. *et al.* **Accumulation pattern of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* Bertoni and its stimulation by red-light**. In Geuns, J. (Ed.), Proceedings of the 5th EUSTAS Stevia symposium "Stevia: Break-through in Europe": v. 5, p. 41-74.
- DACOME, A. S. *et al.* Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. **Process Biochem.**, v. 40, n. 11, p. 3587–3594, 2005.
- FRONZA, D.; FOLEGATTI, M. V. Water consumption of the estevia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni) crop estimated through microlysimeter. **Sci. Agric.**, v. 60, n. 3, p. 595-599, 2003. DOI: 10.1590/S0103-90162003000300028.
- GONZÁLEZ, H. R. *et al.* Comportamiento del cultivo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni em Cuba. **Rev Cubana Plant Med.**, v. 12, n. 4, 2007.

GOTO, A. CLEMENTE. E. Food Science and Technology (Campinas) - On-line version ISSN 1678-457X **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 18, n. 1, 1998. DOI: 10.1590/S0101-20611998000100002.

INDUSTRYARC. **Global Stevia / *Stevia rebaudiana* Market (2013-2018): By Types (Liquid e Powdered); By Application (Dairy, Bakery, Canned Food, Beverages e Others) and By Geography.** Industry ARC. 2014. Disponível em <<http://industryarc.com/Domain/2/agriculture-market-research.html>>. Acessado em 26/10/2014.

KOLB, N. et al. Analysis of Sweet Diterpene Glycosides from *Stevia rebaudiana*: Improved HPLC Method. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 10, p. 4538–4541, 2001. DOI: 10.1021/jf010475p.

LAVINI, A. *et al.* Yield, Quality and Water Consumption of *Stevia rebaudiana* Bertoni Grown under Different Irrigation Regimes in Southern Italy. **Ital. J. Agron.**, v. 2, p. 135-143, 2008. DOI: 10.4081/ija.2008.135.

LIMA FILHO, O. F. **Análise Quantitativa do Crescimento da Estévia.** Documentos: 60. Dourados. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Agropecuária Oeste. p. 29, 2004.

LIMA FILHO, O. F. *et al.* **Sistemas de Produção 5: Estévia.** Dourados. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Agropecuária Oeste. p. 55, 2004.

MADAN, S. *et al.* *Stevia rebaudiana* (Bert.) - A Review. **Indian J Nat Prod Resour.**, v. 1, n. 3, p. 267-286, 2010.

MEJEGI, N. W. *et al.* Introducing *Stevia rebaudiana*, a natural zero-calorie sweetener. **Curr. Sci.**, v. 88, n. 5, p. 801-804, 2005.

MONDAÇA, R. L. et al. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1121-1132, 2012.

MORAES, R. M. et al. Effect of harvest timing on leaf production and yield of diterpene glycosides in *Stevia rebaudiana* Bert: A specialty perennial crop for Mississippi. **Ind. Crop. Prod.**, v. 51, p. 385-389, 2013. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.09.025.

MOTA, T. R.; DACOME, A. S.; COSTA, S. C. **Seleção de Clones de Elite de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertonii com Ênfase no Teor do Rebaudiosídeo A e Atividade Antioxidante.** Anais do Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar. Maringá. 2011.

PAL, P. K. *et al.* Effect of decapitation and nutrient applications on shoot branching, yield, and accumulation of secondary metabolites in leaves of *Stevia rebaudiana* Bertonii. **J. Plant Physiol.**, v. 170, p. 1526-1535, 2013. DOI: 10.1016/j.jplph.2013.06.017.

PAL, P. K. *et al.* Harvesting regimes to optimize yield and quality in annual and perennial *Stevia rebaudiana* under sub-temperate conditions. **Ind. Crop. Prod.**, 2014. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.09.060.

RAMESH K. *et al.* Cultivation of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertonii: a comprehensive review. **Adv. Agron.**, v. 89, p. 137–177, 2006. DOI: 10.1080/03650340701474949.

REDE OFICIAL DE LABORATÓRIOS DE ANÁLISE DE SOLOS-SUL - ROLAS. **Manual de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina.** Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Comissão de Química e Fertilidade do Solo. Porto Alegre. 10^a ed. 2009.

SAAD, A. *et al.* A Review on Potential Toxicity of Artificial Sweeteners vs Safety of Stevia: A Natural Bio-Sweetener. **J. Biol. Agric. Health.**, v. 4. n. 15, p. 137-145, 2014.

SERFATY, M. *et al.* Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant stands and Colheita regime. **Ind. Crop. Prod.**, v. 50, p. 731-736, 2013. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.08.063.

SHYU, Y. T. *et al.* Effects of Harvest dates on the characteristics, yield, and sweet. **J. Agric. Res.**, v. 43, p. 29-39, 1994.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. **Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance.** In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

YADAV, A. K. *et al.* A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertonii)]. **Can. J. Plant. Sci.**, v. 91, n. 1, 2011. DOI: 10.4141/cjps10086

4 MORFOFISIOLOGIA DE ACESSOS DE *Stevia rebaudiana* Bert. E SUA CORRELAÇÃO COM PRODUTIVIDADE DE ESTEVIOSÍDEO E REBAUDIOSÍDEO A

RESUMO

A estévia (*Stevia rebaudiana* Bert.) é uma espécie herbácea da família Asteraceae, nativa do Brasil e Paraguai, mundialmente utilizada como adoçante natural. Contém, em suas folhas, altos teores de esteviosídeo (EST) e rebaudiosídeo A (RA) 300 e 450 vezes mais doces que a sacarose, respectivamente. A demanda mundial por estévia é crescente, no entanto seu cultivo é, ainda, incipiente. O conhecimento das relações entre os perfis morfológicos e a produtividade de massa seca de folha (MSF), EST e RA pode contribuir para adoção de melhores práticas de manejo, para seleção e melhoramento genético. O objetivo deste trabalho foi identificar e avaliar os aspectos morfofisiológicos que afetam a produtividade de EST e RA em sete acessos de estévia. O plantio foi realizado na última semana de outubro de 2013 com espaçamento 25x50 cm e população de 80.000 plantas ha⁻¹. A produtividade de MSF, teor EST e RA, relação entre RA/EST (R/E) e produtividade de EST e RA para as regiões apical, mediana e basal das plantas, índice de área foliar (IAF), área foliar específica (AFE), ramificação, altura e acamamento foram avaliados. Os perfis morfológicos possuem alta correlação com os componentes de rendimento da cultura. Os acessos mais altos, com pouca ramificação e menores IAF e AFE são superiores em RA e R/E. Os acessos 7 e 14 são suscetíveis ao acamamento.

Palavras chave: Esteviosídeo, rebaudiosídeo A, adoçante, estévia, produtividade, morfologia, acamamento.

MORPHOPHYSIOLOGY OF *Stevia rebaudiana* Bert. ACCESSIONS AND ITS CORRELATION WITH STEVIOSIDE AND REBAUDIOSIDE A PRODUCTION

ABSTRACT

Stevia (Stevia rebaudiana Bert.) is an herbaceous species of the family Asteraceae, native to Brazil and Paraguay, natural sweetener widely used in the world. It contains high levels of stevioside (EST) and rebaudioside A (RA) in the leaves which are 300 and 450 times sweeter than sucrose, respectively. The world demand for stevia is increasing but the production is still incipient. The understanding of the relationships between morphological profiles and the production of dry mass of leaf, EST and RA would contribute to the adoption of best management practices, selection of accessions and breeding. The objective of this work was to identify and to evaluate the morphophysiological aspects that affect the productivity of EST and RA in seven stevia accessions. Planting was in the last week of October 2013 with spacing of 25x50 cm and population of 80,000 plants ha⁻¹. The leaf dry weight production, leaf area index (LAI), specific leaf area (SLA), EST and RA content, ratio RA/EST (R/E) and EST and RA yield of apical, median and basal regions, branching, morphology and lodging were evaluated. The morphological profiles have high correlation with stevia yield components. The accessions with high height, low branching, LAI and SLA have higher RA and R/E. The accessions 7 and 14 are more susceptible to lodging.

Keywords: Stevioside, rebaudioside A, sweetener, yield, morphology, lodging.

4.1 INTRODUÇÃO

A estévia (*Stevia rebaudiana* Bert.) é uma espécie herbácea da família Asteraceae, nativa do Brasil e Paraguai, mundialmente utilizada como adoçante natural (LIMA FILHO *et al.*, 2004).

Os mercados norte-americano e europeu abriram-se para comercialização de estévia, respectivamente, nos anos 2008 e 2010, o que acarretou em grande aumento da demanda mundial pela planta (SAAD *et al.*, 2014). No entanto, o cultivo de estévia é, ainda, incipiente e há escassas informações sobre morfofisiologia da espécie, poucas cultivares disponíveis e baixas produtividade e qualidade química (RAMESH *et al.*, 2006; YADAV *et al.*, 2011).

Acessos selvagens de estévia exibem muita diversidade no acúmulo de massa seca de folhas (MSF), dos teores de EST e RA e morfologia e a seleção desses materiais genéticos é uma estratégia eficiente para incremento de produtividade (SHYU *et al.*, 1994; TATEO *et al.*, 1998; ANAMI, 2008). Anami (2008), por exemplo, em avaliação de lavoura comercial de variedade crioula, encontrou clones com teor de RA entre 0,46 e 12,23% e R/E de 0,03 a 1,59.

O melhoramento genético de estévia possibilita o desenvolvimento de cultivares bastante superiores. Enquanto os acessos selvagens e cultivares crioulas possuem em torno de 12% de edulcorantes totais, cultivares melhoradas apresentam valores superiores a 25% (YADAV *et al.*, 2011).

As correlações entre parâmetros morfológicos e os componentes de rendimento em estévia auxiliam os programas de melhoramento, pois possibilitam a realização de seleção precoce de caracteres alvos (ANAMI, 2008).

O avanço nos conhecimentos morfofisiológicos em plantas cultivadas permite o desenvolvimento de técnicas mais avançadas de manejo para maior produtividade e qualidade de matéria prima (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Desta forma, o conhecimento das relações entre os perfis morfológicos e os componentes de rendimento em estévia pode contribuir para adoção de melhores práticas de manejo, para seleção e melhoramento genético.

O objetivo deste trabalho foi identificar e avaliar os aspectos morfofisiológicas que afetam a produtividade de EST e RA e a R/E e o acamamento em sete acessos de estévia.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Características Edafoclimáticas do Experimento

O ensaio foi conduzido em condições de campo no Centro de Estações Experimentais do Canguiri (CEEx – Universidade Federal do Paraná), município de Pinhais, PR, nas coordenadas 25°38'58'' S, 49°12'59'' W, a 916 m de altitude.

O clima da região é classificado como Cfb de Köppen, subtropical super úmido, mesotérmico com verões frescos e geadas severas demasiadamente frequentes, sem estação seca definida. Os dados climáticos do período do experimento estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8 - Condições climáticas ao longo do experimento. Pinhais, 2014.

Variáveis Climáticas	Nov	Dez	Jan	Fev	Média
Precipitação (mm)	105,6	103,8	198,6	135,2	135,8
Temperatura Máxima (°C)	23,7	26,2	28,7	28,1	26,7
Temperatura Mínima (°C)	14,2	16,2	17,4	17,3	16,3
Temperatura Média (°C)	18,0	20,1	21,8	21,6	20,4
Radiação Solar W m ⁻²	352,0	395,0	446,0	397,8	397,7
Umidade Relativa do Ar (%)	87,1	85,0	83,1	83,4	84,7
Fotoperíodo (h)	13,3	13,6	13,4	12,9	13,3

Dados: SIMEPAR, 2014

O solo em análise química e física prévia apresentou pH SMP= 5,2; Al^{+3} = 0,0 $cmol_c dm^{-3}$; $H^+ + Al^{+3}$ = 5,8 $cmol_c dm^{-3}$; Ca^{+2} = 6,1 $cmol_c dm^{-3}$; Mg^{+2} = 3,1 e K^+ = 0,88 $cmol_c dm^{-3}$; P= 35,4 $mg dm^{-3}$; C= 26,3 $g dm^{-3}$; saturação de bases 63% e teor de argila 400 $g kg^{-1}$. Para correção, segundo ROLAS (2009), aplicou-se 4,5 t ha⁻¹ de calcário (Filler, PRNT 95%) para elevar o pH a 6. Foram realizadas duas aragens a 30 cm de profundidade e uma gradagem superficial para preparo do solo.

4.2.2 Material Vegetal

Os acessos denominados 4, 6, 7, 8, 9, 12 e 14 foram fornecidos *in vitro* pela EMBRAPA CENARGEN Brasília, e multiplicados a cada 15 dias no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Utilizou-se meio Murashige e Skoong modificado com 20 g L⁻¹ de sacarose, em sala climatizada com fotoperíodo de 16 h fornecido por lâmpada fluorescente branca fria do tipo luz do dia com densidade de fluxo de fótons de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e temperatura de 25±2 °C.

As mudas foram transplantadas para tubetes de 195 cm³ preenchidos com 2/3 de vermiculita de granulometria fina, e 1/3 de Plantmax HT[®] e acondicionadas para aclimatização por 14 dias em nebulização intermitente de 5 s de irrigação a cada 30 min e 20 dias em cultivo protegido com rega manual diária. Ao final do período, foram selecionadas as mudas com 35 a 40 cm de altura e cinco a seis pares de folhas.

4.2.3 Condução do Experimento

A implantação do experimento a campo foi realizada entre os dias 25 e 27 de outubro de 2013 com espaçamento de 25 cm entre plantas e 50 cm entre linhas, população de 80.000 plantas ha⁻¹. Cada parcela foi formada por 25 plantas, com cinco plantas na linha e cinco linhas. Foram desconsideradas as plantas da bordadura, sendo as plantas úteis apenas as nove centrais.

As mudas foram podadas a 20 cm do solo, permanecendo três pares de folhas. Foi aplicado 39,6 kg ha⁻¹ de nitrogênio em cobertura parcelado em duas aplicações de 44 kg ha⁻¹ de uréia no plantio e 25 dias após o plantio (DAP), segundo recomendação de ROLAS (2009).

Nos primeiros 10 DAP foi realizada irrigação quando necessário. Durante todo o experimento foram feitas capinas semanais controle das plantas daninhas. Aplicou-se calda de *Nicotiana tabacum* L. em concentração de 3% e vazão de 400 L ha⁻¹ para prevenção do ataque de pragas aos 8 DAP.

4.2.4 Avaliação do Experimento

O procedimento de colheita seguiu recomendação de Lima Filho *et al.* (2004), quando as plantas apresentavam-se com 5% de flores abertas, o que ocorreu entre os dias 18 e 27 de fevereiro de 2014 para os acessos: 4 (117 DAP), 6 (123 DAP), 7 (119 DAP), 8 (121 DAP), 9 (114 DAP), 12 (116 DAP) e 14 (119 DAP).

As 9 plantas úteis de cada parcela foram cortadas a 5 cm do solo. As folhas foram separadas do caule manualmente e estratificadas em apical, mediana e basal, pesadas para determinação de massa fresca e armazenadas em sacos de papel multifoliado kraft[®].

Os caules e folhas permaneceram em secador com circulação de ar forçado a 65 °C por 48 horas e foram novamente pesados para determinação da massa seca de folhas (MSF), massa seca de caule (MSC) e massa seca total (MST).

Foram pesados 50 discos de folhas de 0,785 cm² de cada parcela experimental para aferição do índice de área foliar (IAF) calculado proporcionalmente à massa total de folhas da parcela, conforme Souza *et al* (2012).

A altura das plantas foi determinada pela distância do colo ao ponto mais alto da planta. A percentagem de plantas acamadas foi avaliada pela contagem das plantas que posicionaram os ramos na posição horizontal no período do experimento, sem repetição individual na contagem.

A quantidade de ramificações secundárias (R2) e terciárias (R3) foi contada de três plantas sorteadas aleatoriamente de cada parcela. Não foi realizada contagem de ramificações primárias pois as plantas foram podadas na implantação do experimento

Foram calculadas a área foliar específica (AFE) como $AF \text{ MSF}^{-1}$, razão de área foliar (RAF) como $AF \text{ MST}^{-1}$ e razão de peso de folha (RPF) como $MSF \text{ MST}^{-1}$, conforme Portes e Castro (1991). Para auxiliar na determinação do perfil morfológico dos acessos, foi calculado o percentual da MSF presente nas regiões apical, mediana e basal.

4.2.5 Análise dos Teores de EST e RA

As análises do teor de esteviosídeo e Rebaudiosídeo A foram realizadas no Laboratório TECFARMA do departamento de farmácia da Universidade do Sul de Santa Catarina segundo metodologia desenvolvida por Kolb *et al.* (2001)

A quantificação de EST e RA foi realizada por meio de curva de calibração criada por diluição de padrão analítico de esteviosídeo e rebaudiosídeo A Sigma[®].

Foram determinados para as regiões apical, mediana e basal das plantas os teores de EST e RA, soma dos teores de RA e EST (SRE), relação entre RA e EST (R/E) e produtividade de EST e RA.

4.2.6 Delineamento Experimental e Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 repetições. Para as variáveis teor de RA, teor de EST, R/E e proporção de MSF o esquema foi fatorial 7x3 (sete acessos de estévia e 3 regiões das plantas: apical, mediana e basal). Para as variáveis MSF,

MSC, IAF, AFE, RAF, RPF, ramos secundários e ramos terciários foram sete tratamentos referentes aos acessos.

Os dados foram testados quanto à homogeneidade pelo teste de Bartlett. Realizou-se análise de variância ANOVA por meio do programa ASSISTAT® (SILVA e AZEVEDO, 2009) e teste de separação de médias Tukey a 1% de probabilidade de erro.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os acessos apresentaram diferentes padrões de acúmulo de MSF nas regiões apical, mediana e basal das plantas. A região apical apresentou maior proporção de MSF que a região basal para os acessos 6, 7, 8 e 14, quanto que a região basal apresentou maior acúmulo de MSF que a região apical nos acessos 4, 9 e 12 (Tabela 9).

Tabela 9 - Produtividades de MSF, MSC, MST e distribuição da MSF nas regiões apical, mediana e basal de acessos de *Stevia rebaudiana*. Pinhais, 2014.

Acesso	MSF		MSC		MST		Distribuição da MSF					
							Apical		Mediano		Basal	
	kg ha ⁻¹		kg ha ⁻¹		kg ha ⁻¹		%		%		%	
4	4253,2	a	8324,4	a	12578	a	27,3	B d	37,2	A a	35,5	A b
6	3255,1	d	6691,6	c	9947	c	38,1	A b	32,8	B bc	29,1	C c
7	3247,5	d	5408,5	d	8656	d	40,9	A a	33,9	B b	25,2	C d
8	2818,8	f	5627,2	d	8446	d	39,4	A ab	38,3	A a	22,4	B e
9	4031,8	b	7870,6	ab	11902	ab	29,4	B cd	34,8	A b	35,7	A b
12	3733,1	c	7419,2	b	11152	b	29,9	B c	31,2	B c	38,9	A a
14	3090,9	e	6423,6	c	9515	c	37,8	A b	27,9	C d	34,3	B b
Média	3490,0		6823,6		10314		34,7		33,7		31,6	
CV (%)	3,12		3,52		4,13				3,30			

Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey $p < 0,01$.

O acesso 7 apresentou a maior proporção de MSF apical, seguido pelos acessos 6 e 14, enquanto o acesso 12 exibiu a maior proporção da MSF basal, seguido pelo acesso 4. Desta forma, há um grupo de acessos que apresentam padrão morfológico de concentração da MSF na parte apical (acessos 6, 7, 8, 14) e outro grupo com padrão de concentração da MSF na parte basal (acessos 4, 9 e 12).

Os acessos 4 e 8 apresentaram maior teor de EST na região apical. Os acessos 7 e 14 exibiram os maiores teores de RA para todas as regiões da planta, seguidos pelo acesso 6. Os acessos 4 e 12 apresentaram os menores teores de RA para todas as regiões das plantas (Tabela 10).

As regiões apical, mediana e basal apresentaram os mesmos teores de EST nos acessos 7, 9, 12 e 14 e os mesmos teores de RA nos acessos 4, 12 e 14. A região apical apresentou maior teor de EST que a região basal para os acessos 4 e 8, maior teor de RA para os acessos 7, 8 e 9.

Estes resultados demonstram que, embora o teor de EST e RA seja igual nas diferentes regiões da planta para a maioria dos acessos, alguns destes exibiram redução dos teores nas regiões mediana e basal. Bondarev *et al.* (2003, 2010), Guleria e Yadav (2011) e Ceunen e Geuns (2013) também relatam maiores teores de SRE nas folhas da região apical das plantas.

Tabela 10 - Teor de RA e EST das regiões apical, mediana e basal de acessos de *Stevia rebaudiana*. Pinhais, 2014.

Acesso	EST			RA		
	Apical %	Mediano %	Basal %	Apical %	Mediano %	Basal %
4	16,98 A a	17,53 A a	15,22 B a	3,17 A e	3,19 A d	2,84 A e
6	9,11 B e	11,88 A d	11,86 A c	9,98 B b	10,78 A b	10,36 AB b
7	13,23 A bc	14,29 A b	14,15 A ab	14,87 A a	14,05 B a	13,19 C a
8	16,09 A a	14,44 B b	14,08 B ab	8,13 A c	7,08 B c	6,91 B c
9	11,70 A d	11,81 A d	12,39 A c	6,64 A d	6,21 A c	4,98 B d
12	14,57 A b	13,91 A bc	14,25 A ab	2,44 A e	2,34 A d	2,44 A e
14	12,96 A cd	12,59 A cd	12,90 A bc	14,08 A a	14,05 A a	13,49 A a
Média	13,52	13,78	13,55	8,48	8,24	7,75
CV (%)	4,29			4,55		

Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey $p < 0,01$.

Guleria e Yadav (2011) encontraram nas folhas novas da região apical de estévia maior expressão dos microRNAs miR169, miR319 e miR164 que podem estar relacionados com a maior expressão dos genes responsáveis pela síntese de EST e RA. Desta forma, é possível que o maior teor de SRE na região apical das plantas decorra de mecanismos regulatórios da expressão gênica durante o desenvolvimento foliar.

Bondarev *et al.* (2003, 2010) sugerem que SRE sejam produzidos em tricomas glandulares por terem encontrado alta correlação entre densidade de tricomas glandulares e teor de SRE em folhas de estévia. Sendo assim, o maior teor de SRE nas folhas da região apical das plantas pode estar relacionado à maior densidade de tricomas glandulares, devido à incompleta expansão foliar destes tecidos mais jovens (Bondarev *et al.*, 2010; YADAV *et al.*, 2011).

As folhas apicais recebem maior intensidade luminosa e podem ter maior disponibilidade energética para fotossíntese e maior disponibilidade de substrato para o metabolismo secundário e síntese de EST e RA.

Como o teor de EST e RA não variou entre as folhas das regiões apical, mediana e basal para a maioria dos acessos, a R/E manteve o mesmo comportamento. Os acessos 6, 7 e 9 apresentaram R/E maior na região apical que na região basal (Tabela 11). Bondarev *et al.* (2003, 2010) e Ceunen e Geuns (2013) também relataram maior R/E na região apical das plantas de estévia.

As funções ecológicas dos edulcorantes em estévia ainda não são conhecidas. Especula-se que possa ter efeito repelente ou que participe de um mecanismo de controle dos níveis de ácido giberélico, já que possuem a mesma rota metabólica (YADAV *et al.*, 2011). O conhecimento das funções ecológicas destes compostos pode auxiliar no entendimento da dinâmica de acúmulo e na relação dos teores de EST e RA.

Tabela 11 - R/E nas regiões apical, mediana e basal de acessos de *Stevia rebaudiana*. Pinhais, 2014.

Acessos	Apical %	Mediano %	Basal %
4	0,19 A c	0,18 A d	0,19 A d
6	1,10 A a	0,91 B b	0,88 B b
7	1,13 A a	0,99 B b	0,93 B b
8	0,51 A b	0,49 A c	0,49 A c
9	0,57 A b	0,53 A c	0,40 B c
12	0,17 A c	0,17 A d	0,17 A d
14	1,09 A a	1,12 A a	1,05 A a
Média	0,68	0,63	0,59
CV (%)	7,02		

Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey $p < 0,01$.

A análise de correlação entre caracteres morfofisiológicos e os componentes de rendimento de acessos de estévia demonstra que o percentual da MSF na região apical das plantas exibiu correlação alta com teores de RA e SRE e R/E, enquanto o percentual de MSF nas regiões mediana e basal apresentaram alta correlação com a produtividade de MSF (Tabela 12).

Este parâmetro pode ser importante para seleção de novos acessos e melhoramento genético de estévia, pois o teor de RA e R/E podem estar associados a um perfil morfológico de maior concentração da MSF na região apical, enquanto a concentração de MSF nas regiões mediana e basal pode estar associada a materiais genéticos com maior produtividade de MSF. Segundo Anami (2008) estas correlações auxiliam na seleção e melhoramento genético, pois permitem a seleção de caracteres alvo de forma precoce e a campo.

O caule de estévia possui baixo teor de edulcorantes, porém, pode conter intensificadores de sabor potenciais para industrialização de alimentos e bebidas. Em geral, o

caule é processado juntamente às folhas na extração de EST e RA, possui baixo valor comercial e é indesejado (SINGH e RAO, 2005).

Tabela 12 - Correlação entre caracteres morfofisiológicos e componentes de rendimento de acessos de *Stevia rebaudiana*. Pinhais, 2014.

Índices	EST %	RA %	R/E g g ⁻¹	EST kg ha ⁻¹	RA kg ha ⁻¹	SRE %	SRE kg ha ⁻¹	MSF kg ha ⁻¹
Apical (%)	-0,32	0,85	0,81	-0,79	0,77	0,81	0,16	-0,11
Mediana (%)	0,49	-0,43	-0,49	0,39	-0,44	-0,27	-0,15	0,88
Basal (%)	0,01	-0,52	-0,45	0,50	-0,45	-0,58	-0,06	0,93
Caule (kg ha ⁻¹)	0,15	-0,74	-0,66	0,70	-0,65	-0,76	-0,10	0,92
IAF (m ² m ⁻²)	-0,03	-0,78	-0,68	0,54	-0,68	-0,88	-0,30	0,87
RAF (m ² kg ⁻¹)	-0,25	-0,71	-0,60	0,22	-0,64	-0,91	-0,59	0,62
AFE (m ² kg ⁻¹)	-0,29	-0,70	-0,57	0,15	-0,65	-0,92	-0,67	0,54
RPF (kg kg ⁻¹)	0,25	0,28	0,16	0,10	0,32	0,43	0,52	-0,04
Altura (m)	0,13	0,55	0,47	0,02	0,55	0,68	0,73	-0,14
Ramos secundários	-0,28	-0,59	-0,50	0,17	-0,50	-0,79	-0,47	0,58
Ramos terciários	-0,28	-0,40	-0,34	0,12	-0,30	-0,57	-0,27	0,51
Est (%)		-0,46	-0,61	0,77	-0,51	-0,08	0,16	0,03
RA (%)			0,98	-0,70	0,99	0,92	0,53	-0,71
EST (kg ha ⁻¹)					-0,65	-0,45	0,21	0,79
RA kg ha ⁻¹)						0,88	0,61	-0,56
SRE (%)							0,67	-0,71
SRE (kg ha ⁻¹)								-0,25

O acesso 7 apresentou a maior RPF (Tabela 13). Este parâmetro é de especial importância pois trata-se do índice de colheita para a cultura da estêvia, tendo em vista que a folha é a parte da planta de interesse para indústria.

Tabela 13 - IAF, AFE, RAF, RPF e número de ramos secundários e terciários de acessos de *Stevia rebaudiana*. Pinhais, 2014.

Acesso	IAF m ² m ⁻²	AFE m ² kg ⁻¹	RAF m ² kg ⁻¹	RPF g g ⁻¹	R2 un. planta ⁻¹	R3 un. planta ⁻¹
4	6,02 b	14,15 cd	4,79 cd	0,34 b	33,8 c	337,4 b
6	4,93 c	15,29 bc	5,00 bc	0,33 bc	34,6 c	260,7 b
7	3,51 d	10,82 f	4,06 e	0,38 a	20,2 d	109,4 c
8	3,84 d	13,62 de	4,55 d	0,34 bc	32,4 c	360,4 b
9	7,01 a	17,37 a	5,89 a	0,34 b	70,6 a	1398,8 a
12	6,06 b	16,24 ab	5,43 b	0,33 bc	46,2 b	340,6 b
14	3,89 d	12,58 e	4,09 e	0,32 c	24,6 d	132,6 c
CV (%)	6,39	5,34	4,62	6,93	5,86	12,10

Médias seguidas por letras distintas nas colunas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey p<0,01.

Com menor proporção de caule, há menor volume de material para transporte, secagem, processamento e extração, a secagem torna-se mais fácil, pois as folhas secam mais

rápido que os caules. E com a menor retirada de MSC da lavoura, há menor extração de nutrientes e menor demanda de adubação, o que confere sustentabilidade ao cultivo.

A produtividade de MSC apresentou correlação negativa com teores de RA, SRE e R/E e pode ser um parâmetro associado a materiais genéticos inferiores para composição química.

Os acessos apresentaram IAF significativamente distintos, entre 3,51 e 7,01, valores próximos ao encontrado por Fronza e Folegatti (2003) de 4,83. Alto IAF é um parâmetro desejado pela tendência à maiores produção de folhas, cobertura do solo e desempenho na competição por luz com as plantas espontâneas.

O IAF apresentou alta correlação com MSF e correlação negativa com R/E e teores de RA e SRE. Os baixos teores de RA encontrados nos acessos com alto IAF podem ser consequência da expansão foliar e redução da densidade de tricomas glandulares que, segundo Bondarev *et al.* (2003, 2010) são responsáveis pela produção de edulcorantes.

Entretanto, a correlação negativa entre IAF e teor de SRE pode ser devido à maior disponibilidade de luz para as folhas de plantas com menor IAF e melhores condições fotossintéticas e disponibilidade de substrato para o metabolismo secundário. Ensaio de dinâmica de densidade de plantas e IAF podem sugerir tais resultados.

Serfaty *et al.* (2013) testaram diferentes densidades de plantas e não encontraram variação significativa no teor de edulcorantes, no entanto, relataram aumento da produtividade de SRE promovido pelo aumento de MSF.

Os acessos apresentaram AFE significativamente distintas, entre 10,82 e 17,37 m² kg⁻¹. Esta variação pode corresponder às características genéticas dos acessos ou pode ser influência do IAF, pois alto IAF resulta em maior sombreamento das folhas e formação de folhas menos espessas com maior AFE. A correlação entre IAF e AFE foi 0,88.

A AFE e RAF apresentaram alta correlação negativa com RA e SRE. Shyu *et al.* (1994) também obtiveram elevada correlação entre AFE e teores de SRE. A altura exibiu alta correlação com teor e produtividade de SRE enquanto o número de ramos secundários apresentou correlação negativa com teor de SRE, resultados similares ao encontrado por Tateo *et al.* (1998). Sendo assim, acessos com perfil morfológico de altura elevada, baixa ramificação e baixas AFE e RAF podem estar associados a materiais genéticos com maior potencial de produção de edulcorantes em estévia.

A produtividade de MSF apresentou correlação negativa com teor de SRE, similar ao relatado por Ceunen e Geuns (2013). O aumento da produção de biomassa resultante do

metabolismo primário de plantas muitas vezes não é acompanhado de forma diretamente proporcional pela produção de metabólitos secundários (TAIZ e ZEIGER, 2009).

O teor de RA apresentou alta correlação com SRE e R/E, o que infere que este composto foi o determinante para definição do perfil químico dos acessos, e que o EST foi similar entre os acessos, enquanto RA exibiu maior variação.

Houve correlação de 0,99 entre teor e produtividade de RA, o que indica que a seleção de acessos com maior teor de RA é eficiente para o desenvolvimento materiais genéticos com alto potencial de produtividade de RA.

A altura é um parâmetro morfológico que influencia a suscetibilidade das plantas ao acamamento (BERRY *et al.*, 2004), sendo que os acessos 7 e 14, com maior altura, apresentaram maior percentual de acamamento (Tabela 14). A correlação entre altura dos acessos e acamamento apresentou-se alta (0,89).

Tabela 14 - Altura (m) e acamamento (%) de acessos de *eStevia rebaudiana*. Pinhais, 2014.

Índice	Acessos														CV (%)
	4	6	7	8	9	12	14								
Altura	0,91	b	0,78	bc	1,09	a	0,70	c	0,71	c	0,90	b	1,15	a	8,43
Acamamento	11,1	bc	22,2	b	93,3	a	8,9	bc	0	c	11,1	bc	95,6	a	25,2

Médias seguidas por letras distintas nas linhas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey $p < 0,05$.

A disponibilidade de nitrogênio no solo e o espaçamento de plantio são fatores determinantes na suscetibilidade das plantas ao acamamento (MARINO *et al.*, 2011). O solo deste experimento possuía alto teor de matéria orgânica, o que, juntamente à adubação nitrogenada, pode ter influenciado no demasiado crescimento em altura e no acamamento dos acessos 7 e 14. O espaçamento utilizado neste trabalho é usual em lavouras comerciais (LIMA FILHO *et al.*, 2004), porém experimentos com diferentes populações podem sugerir densidade de plantio ideal para os acessos que apresentaram acamamento.

4.4 CONCLUSÕES

O padrão de distribuição de MSF ao longo das plantas de *estévia* varia conforme o acesso e pode ser uma característica de cada material genético. Os teores de EST e RA mantêm-se constantes ao longo do perfil das plantas para a maioria dos acessos e tendem a ser maiores na parte apical para alguns acessos.

Os perfis morfológicos em estévia possuem alta correlação com os componentes de rendimento e podem ser utilizados na seleção e melhoramento genético. Os acessos com maior altura, menor ramificação e baixos IAF e AFE são superiores em RA e R/E.

Os acessos 7 e 14 são mais altos e suscetíveis ao acamamento.

REFERÊNCIAS

- ANAMI, R. T. **Caracterização e divergência genética em clones de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni**. 48 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2008.
- BERRY, P. M. et al. Understanding and Reducing Lodging in Cereals. **Adv. Agron**, v. 84, p. 217–271, 2004. DOI: 10.1016/S0065-2113(04)84005-7.
- BONDAREV, N. I. *et al.* Steviol Glycoside Content in Different Organs of *Stevia rebaudiana* and Its Dynamics during Ontogeny. **Biol. Plant**. v. 47, n. 2, p. 261-264, 2003. DOI 10.1023/B:BIOP.0000022261.35259.4f.
- BONDAREV, N. I. *et al.* Morphology and ultrastructure of trichomes of intact and in vitro plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni with reference to biosynthesis and accumulation of steviol glycosides. **Moscow University Biological Sciences Bulletin**. v. 65, n. 1, p. 12-16, 2010.
- CEUNEN, S.; GEUNS, J. M. C. Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). **Plant Sci**. v. 198. p. 72-82, 2013. DOI: 10.1016/j.plantsci.2012.10.003.
- FRONZA, D.; FOLEGATTI, M. V. Water consumption of the estevia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni) crop estimated through microlysimeter. **Sci. Agric**. v. 60. n. 3, 2003. DOI: 10.1590/S0103-90162003000300028.
- GULERIA, P.; YADAV, S. K. Identification of miR414 and Expression Analysis of Conserved miRNAs from *Stevia rebaudiana*. **Genomics, Proteomics e Bioinformatics**. v. 9, n. 6, 2011. DOI:10.1016/S1672-0229(11)60024-7.
- KOLB, N. et al. Analysis of Sweet Diterpene Glycosides from *Stevia rebaudiana*: Improved HPLC Method. **J. Agric. Food Chem.**, 2001, 49 (10), pp 4538–4541 DOI: 10.1021/jf010475p.
- LIMA FILHO, O. F. *et al.* **Sistemas de Produção 5: Estévia**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Agropecuária Oeste. Dourados. p. 55, 2004.
- PORTES, T. A.; CASTRO, L. G. Análise de crescimento de plantas: um programa computacional auxiliar. **Rev. Bras. Fisiol. Vegetal**. v. 3, n. 1, p. 53-56, 1991.

RAMESH K. *et al.* Cultivation of Stevia *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: a comprehensive review. **Adv. Agron.** v. 89, p. 137–177, 2006. DOI: 10.1080/03650340701474949.

REDE OFICIAL DE LABORATÓRIOS DE ANÁLISE DE SOLOS-SUL - ROLAS. **Manual de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina.** Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Comissão de Química e Fertilidade do Solo. Porto Alegre. 10^a ed, 2004.

SAAD, A. *et al.* A Review on Potential Toxicity of Artificial Sweeteners vs Safety of Stevia: A Natural Bio-Sweetner. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare.** v. 4. n. 15. p. 137-145, 2014.

SERFATY, M. *et al.* Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant stands and Colheita regime. **Ind. Crop. Prod.** v. 50, p. 731-736, 2013. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.08.063.

SHYU, Y. T. *et al.* Effects of harvest dates on the characteristics, yield, and sweet. **J. Agric. Res.** Taiwan. v. 43, p. 29-39, 1994.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. **Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance.** In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SINGH, S. D.; RAO, G. P. Stevia: The herbal sugar of the 21st century. **Sugar Technol.** v. 7, p. 17-24, 2005. DOI: 10.1007/BF02942413.

SOUZA, M. S. *et al.* Comparação de métodos de mensuração de área foliar para a cultura da melancia. **Pesq. Agropec. Trop.**, v. 42, n.2, p. 241-245, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 4ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848p.

TATEO, F. *et al.* Stevioside content and morphological variability in a population of *Stevia rebaudiana* Bertoni from Paraguay. **Ital. J. Food Sci.** v. 10, n. 3, p. 261-267, 1998.

YADAV, A. K.; DHYANI, S. D.; AHUJA, P. S. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. **Can. J. Plant Sci.** v. 91, n. 1, 2011. DOI: 10.4141/cjps10086.

5 TOLERÂNCIA À GEADA DE ACESSOS DE *Stevia rebaudiana* Bert.

RESUMO

A estévia (*Stevia rebaudiana* Bert.) possui em suas folhas glicosídeos diterpênicos edulcorantes e é a espécie mais importante no mundo para produção de adoçante natural. A estévia é originária de clima quente e com pouca ocorrência de geada e não há ensaios para determinação de tolerância de materiais genéticos à baixas temperaturas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a tolerância à geada de sete acessos de estévia na região metropolitana de Curitiba. O plantio foi realizado na última semana de outubro de 2013 no Centro de Estações Experimentais do Canguiri, em Pinhais, Paraná, a 916 m de altitude, com espaçamento 25x50 cm e população de 80.000 plantas ha⁻¹. A incidência de lesões nas folhas, parte apical e flores e porcentagem da área das folhas com lesões provocadas por geada foram avaliadas. Os acessos 4, 7 e 8 apresentaram maior tolerância à geada.

Palavras chave: Esteviosídeo, rebaudiosídeo A, adoçante, estévia, frio, temperatura.

TOLERANCE TO FROST IN *Stevia rebaudiana* Bert ACCESSIONS

ABSTRACT

Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) has glycosides diterpenic sweeteners being considered the most important species for production of natural sweeteners. *Stevia* is native to warm weather, with low occurrence of frost and there are no studies to determine tolerance to low temperature. This research aimed to evaluate the tolerance to frost of seven *stevia* accessions in the metropolitan region of Curitiba, Paraná, Brazil. The planting was in the last week of October 2013 with spacing of 25x50 cm and population of 80,000 plants ha⁻¹. The incidence of lesions on leaves, flowers and apical meristem, the percentage of the area of leaves with injuries caused by frost were evaluated. Accessions 4, 7 and 8 are tolerance to frost.

Keywords: Stevioside, rebaudioside A, sweetener, *stevia*, cold, temperature.

5.1 INTRODUÇÃO

A estévia (*Stevia rebaudiana* Bert.) possui elevados teores de glicosídeos diterpênicos edulcorantes em suas folhas e é a espécie mais importante para produção de adoçante natural no mundo (INDUSTRYARC, 2014).

O centro de origem da estévia é a região da serra do Amambai, que compreende o nordeste do Paraguai e parte do estado do Mato Grosso do Sul, e a planta é considerada de clima quente (LIMA FILHO *et al.*, 2004). Esta região possui clima Aw e Cwa de Köppen com temperaturas médias de, respectivamente, 27 e 22 °C e baixa frequência de geadas.

A parte aérea da estévia é suscetível à geada, porém a base do caule localiza-se sob o solo e resiste à temperatura do ar abaixo de 0 °C. No cultivo em regiões com inverno rigoroso a planta retoma brotação a partir da base do caule com a elevação da temperatura na primavera (MORAES *et al.*, 2013).

O cultivo de estévia é incipiente e não há ensaios de avaliação de materiais genéticos resistentes à geada em condições de clima frio, como subtropical Cfb de Köppen.

Populações selvagens de estévia apresentam grande variação fenotípica (TATEO *et al.*, 1998; ANAMI, 2008). Desta forma, a avaliação de acessos selvagens pode resultar na obtenção de materiais genéticos adaptados às condições de clima frio com presença de geadas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a tolerância à geada de sete acessos de estévia.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Características Edafoclimáticas do Experimento

O ensaio foi conduzido em condições de campo no Centro de Estações Experimentais do Canguiri (CEEx – Universidade Federal do Paraná), município de Pinhais, PR, nas coordenadas 25°38'58'' S, 49°12'59'' W, a 916 m de altitude.

O clima da região é classificado como Cfb de Köppen, subtropical super úmido, mesotérmico com verões frescos e geadas severas demasiadamente frequentes, sem estação seca definida. Os valores de temperatura mínima diária ao longo do experimento estão dispostos na Figura 7.

O solo em análise química e física prévia apresentou pH SMP= 5,2; $Al^{+3}= 0,0 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; $H^+ + Al^{+3}= 5,8 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; $Ca^{+2}= 6,1 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; $Mg^{+2}= 3,1$ e $K^+= 0,88 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$;

P= 35,4 mg dm⁻³; C= 26,3 g dm⁻³; saturação de bases 63% e teor de argila 400 g kg⁻¹. Para correção, segundo ROLAS (2009), aplicou-se 4,5 t ha⁻¹ de calcário Filler PRNT 95%. Foram realizadas duas aragens a 30 cm de profundidade e uma gradagem superficial para preparo do solo.

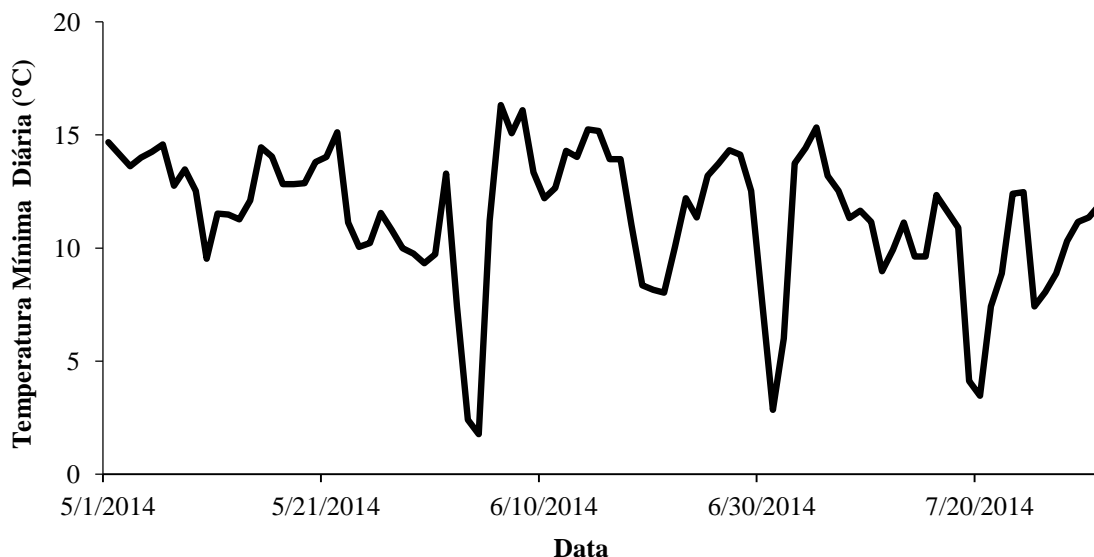


Figura 7 - Temperatura mínima diária durante o experimento na estação meteorológica do SIMEPAR, localizada em Pinhais, PR.

5.2.2 Material Vegetal

Os acessos denominados 4, 6, 7, 8, 9, 12 e 14 foram fornecidos *in vitro* pela EMBRAPA CENARGEN Brasília, e multiplicados a cada 15 dias no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Utilizou-se meio Murashige e Skoong modificado com 20 g L⁻¹ de sacarose, em sala climatizada com fotoperíodo de 16 h fornecido por lâmpada fluorescente branca fria do tipo luz do dia com densidade de fluxo de fótons de 20 µmol m⁻² s⁻¹, e temperatura de 25±2 °C.

As mudas foram transplantadas para tubetes de 195 cm³ preenchidos com 2/3 de vermiculita de granulometria fina, e 1/3 de Plantmax HT[®] e acondicionadas para aclimatização por 14 dias em nebulização intermitente de 5 s de irrigação a cada 30 min e 20 dias em cultivo protegido com rega manual diária. Ao final do período, foram selecionadas as mudas com 35 a 40 cm de altura e cinco a seis pares de folhas.

5.2.3 Condições do Experimento

A implantação do experimento a campo foi realizada entre os dias 25 e 27 de outubro de 2013 com espaçamento de 25 cm entre plantas e 50 cm entre linhas, população de 80.000 plantas ha^{-1} . As mudas foram podadas a 20 cm do solo, permanecendo três pares de folhas. Foi aplicado 39,6 kg ha^{-1} de nitrogênio em cobertura parcelado em duas aplicações de 44 kg ha^{-1} de uréia no plantio e 25 dias após o plantio (DAP), segundo recomendação de ROLAS (2009).

Nos primeiros 10 DAP foi realizada irrigação quando necessário e durante todo o experimento foram feitas capinas semanais controle das plantas daninhas. Aplicou-se calda de *Nicotiana tabacum* L. em concentração de 3% e vazão de 400 L ha^{-1} para prevenção do ataque de pragas aos 8 DAP.

5.2.4 Avaliação do Experimento

O experimento foi avaliado cinco dias após a geada ocorrida em 04 de junho de 2014, que consistiu a geada de maior impacto nas plantas da área experimental no ano avaliado, com temperatura mínima do dia de 1,7 °C. As plantas estavam em rebrote, 21 dias após a última colheita.

A avaliação de incidência de lesão por geada foi realizada pela porcentagem das folhas apicais, medianas e basais, flores e parte apical do caule (3 cm) com lesões provocadas por geada de quatro plantas selecionadas aleatoriamente em cada parcela.

Para avaliação do percentual da área das folhas com danos por geada, foram atribuídas notas por meio de observação visual de avaliador treinado para as mesmas quatro plantas. As notas variaram de um a cinco para, respectivamente, 0 a 20%, 20 a 40%, 40 a 60%, 60 a 80% e 80 a 100% da área da folha afetada pela geada, segundo escala diagramática adaptada de ALBERT *et al.* (2008).

As médias das notas foram transformadas em percentual da área das folhas com dano, considerando a média de cada intervalo, ou seja, para as notas de 1 a 5 foram atribuídos, respectivamente, 10, 30, 50, 70 e 90% para análise estatística e interpretação dos dados.

5.2.5 Delineamento Experimental e Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com sete tratamentos (acessos de estévia) e 5 repetições. Cada parcela foi formada por 25 plantas, com espaçamento de 0,5 m entre linhas e 0,25 m entre plantas, com cinco plantas na linha e cinco linhas. Foram desconsideradas as plantas da bordadura, sendo as plantas úteis apenas as nove centrais.

Os dados foram testados quanto à homogeneidade pelo teste de Bartlett. Realizou-se análise de variância ANOVA por meio do programa ASSISTAT® (SILVA e AZEVEDO, 2009) e teste de separação de médias Tukey a 5% de probabilidade de erro.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O acesso 14 apresentou maior incidência de lesões que os demais nas folhas apicais, medianas e basais, mostrando-se suscetível à geada, enquanto os acessos 4, 7 e 8, por sua vez, apresentaram menor incidência de lesões nas folhas apicais. Estes mesmos acessos apresentaram menor incidência de lesões também para folhas medianas, porém, sem diferença estatística para o acesso 9 (Tabela 15).

Os acessos 4 e 8 apresentam as menores incidências de lesão na parte apical e o acesso 8, seguido pelo acesso 4, apresentou a menor incidência de lesão em flores. Os acessos 6, 7 e 14 apresentaram as maiores incidências de lesões na parte apical, sem diferença estatística para o acesso 9.

As folhas são a parte de maior interesse comercial no cultivo de estévia (YADAV *et al.*, 2011). A incidência de danos nas flores pode não ocasionar perdas de rendimento, no entanto, lesões na parte apical podem comprometer o desenvolvimento da planta e a produtividade de EST e RA.

Tabela 15 - Incidência de lesões (%) provocadas por geada nas diferentes regiões das plantas em acessos de *Stevia rebaudiana*. Pinhais, 2014.

Em acessos de <i>Sesuvia portulacastrum</i> : F. Pinheiro, 2017.																
Parte da Planta	Acessos															
	4	6	7	8	9	12	14	Média								
Flor	78,3	Ba	94,1	Aa	91,1	Aa	27,3	Ca	96,6	A a	97,3	A a	97,3	A a	83,1	
Parte Apical	25,1	Cb	97,7	Aa	91,1	Aa	28,2	Ca	86,3	ABa	75,1	B b	91,7	Aab	70,7	
Folhas Apicais	9,4	Dc	41,4	Cb	15,3	Db	15,5	Db	57,3	B b	53,8	BCc	94,4	Aab	41,0	
Folhas Medianas	6,0	Cc	28,2	Bc	10,0	Cb	6,9	Cb	16,7	BCc	28,5	B d	83,5	Abc	25,7	
Folhas Basais	3,2	Bc	15,2	Bd	4,7	Bb	4,2	Bb	3,6	B d	11,9	B e	78,6	A c	17,4	
CV (%)	13,85															

Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey $p < 0,05$.

As flores e a parte apical apresentaram maior incidência de lesões do que as folhas para os acessos 4, 6, 7, 8, 9 e 12. As folhas apicais exibiram maior incidência de lesões do que as folhas basais para os acessos 6, 9, 12 e 14.

Estes resultados evidenciam que, embora haja diferença entre os acessos, a maioria apresenta incidência de lesões nas flores e parte apical maior do que nas folhas. Em relação às folhas, apresentam maior incidência de lesões nas folhas apicais e menor nas folhas basais.

Além da maior incidência, o acesso 14 apresentou as maiores áreas lesionadas nas folhas apicais, medianas e basais. Os demais acessos não diferiram entre si para área das folhas basais e medianas com lesão. Os acessos 4, 6, 7 e 8 foram os que apresentaram menor área de folhas apicais lesionada (Tabela 16).

Tabela 16 - Área das folhas com lesão (%) provocadas por geada em acessos de *Stevia rebaudiana*. Pinhais, 2014.

Resistência: Fungos, 2011.															
Parte da Planta	Acessos														
	4		6		7		8		9		12		14		Média
Folhas Apicais	14,0	Ca	22,0	Ca	10,0	Ca	10,0	Ca	38,0	B a	38,0	Ba	74,0	Aa	
Folhas Medianas	10,0	Ba	14,0	Bab	10,0	Ba	10,0	Ba	14,0	B b	14,0	Bb	54,0	Ab	18,0
Folhas Basais	10,0	Ba	10,0	Bb	10,0	Ba	10,0	Ba	10,0	B b	10,0	Bb	34,0	Ac	13,4
Média	11,3		15,3		10,0		10,0		20,7		20,7		54,0		-
CV (%)	21,85														

Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey $p < 0,05$.

As folhas apicais apresentaram maior área lesionada que as folhas basais para os acessos 6, 9, 12 e 14 e mostraram-se mais suscetíveis.

A suscetibilidade das plantas à geada se dá pela capacidade de tolerância à temperatura de congelamento, determinada pelas estratégias fisiológicas para reduzir a temperatura de congelamento e suportar formação de cristais de gelo na região intracelular e consequente desidratação das células (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Um dos mecanismos de tolerância às baixas temperaturas consiste no aumento da concentração de solutos nas células, como açúcares, aminoácidos e proteínas que diminuem a temperatura de fusão da água e auxiliam na redução do potencial hídrico por meio da redução do potencial osmótico (FUJIKAWA *et al.*, 1999; GOUNARIS, 2001; GUSTA *et al.*, 2004).

Outras estratégias envolvem a presença de proteínas e açúcares com efeitos crioprotetores que estabilizam as membranas e proteínas das células durante o estresse de frio (BRETON *et al.*, 2000), a presença de proteínas anticongelamento que impedem a formação e crescimento dos cristais de gelo, e a maior concentração nas membranas plasmáticas de

ácidos graxos não saturados que são mais resistentes à redução de temperatura (PEARCE, 2001).

O grau de expressão destas estratégias de proteção ao frio pode ser definido pela característica genética dos acessos. Neste caso, o acesso 14 pode apresentar suscetibilidade à geada e deve ser cultivado preferencialmente em regiões com baixa ocorrência de geadas. Da mesma forma, os acessos 4, 7 e 8 foram mais tolerantes à geada e mostraram maior adaptação para cultivo em clima Cfb de Köppen.

De acordo com Melo-Abreu e Ribeiro (2010), plantas que apresentam alta taxa de divisão e alongamento celular são mais suscetíveis à geada. Desta forma, a diferença exibida pelos acessos para tolerância à geada pode ser, em parte, devido à atividade metabólica no momento do estresse ao frio.

As folhas apicais apresentaram maior área lesionada que as folhas basais para os acessos 6, 9, 12 e 14. Segundo Pearce (2001) e Melo-Abreu e Ribeiro (2010), flores, parte apical e folhas em formação e crescimento são tecidos jovens, pouco lignificados, com alto teor de água e elevada atividade metabólica e, por isso, são mais sensíveis à geada.

5.4 CONCLUSÕES

As regiões das plantas apresentam comportamentos distintos quanto à tolerância à geada. As flores e parte apical são mais suscetíveis à geada que as folhas e as folhas apicais são mais suscetíveis à geada que as folhas basais.

Os acessos 4, 7 e 8 são mais tolerantes à geada e o acesso 14 é suscetível à geada.

REFERÊNCIAS

ALBERT, I. C. L. *et al.* Escala diagramática para avaliação da severidade da cercosporiose em caupi. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, 2008 .

ANAMI, R. T. **Caracterização e divergência genética em clones de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni**. 48 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2008.

BRETON *et al.* Biotechnological applications of plant freezing associated proteins. **Biotechnol. Annu. Rev.**, v. 6, p. 59–101, 2000. DOI: 10.1016/S1387-2656(00)06019-1.

FUJIKAWA, S.; JITSUYAMA, Y.; KURODA, K. Determination of the role of cold acclimation-induced diverse changes in plant cells from the viewpoint of avoidance of freezing injury. **J. Plant Res.**, v.112, p.237-244, 1999. DOI: 10.1007/PL00013880.

GOUNARIS, Y. A qualitative model for the mechanism of sugar accumulation in cold-stressed plant tissues. **Theory Biosci.**, v. 120, n. 2, p. 149–165, 2001. DOI: 10.1078/1431-7613-00036

GUSTA, L.V.*et al.* The effect of water, sugars and proteins on the pattern of ice nucleation and propagation in acclimated and nonacclimated canola leaves. **Plant Physiol.**, v.135, p.1642-2653, 2004. DOI: 10.1104/pp.103.028308.

INDUSTRYARC. **Global Stevia / *Stevia rebaudiana* Market (2013-2018): By Types (Liquid e Powdered); By Application (Dairy, Bakery, Canned Food, Beverages e Others) and By Geography**. Industry ARC. 2014. <<http://industryarc.com/Domain/2/agriculture-market-research.html>>.

LIMA FILHO, O. F. *et al.* **Sistemas de Produção 5: Estévia**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Agropecuária Oeste. Dourados. p. 55, 2004.

LOYCE, C. *et al.* Interaction between cultivar and crop management effects on winter wheat diseases, lodging, and yield. **Crop Prot.**, v. 27, n. 7, p. 1131–1142, 2008. DOI: 10.1016/j.cropro.2008.02.001.

MARINO, S. *et al.* Effects of varying nitrogen fertilization on crop yield and grain quality of emmer grown in a typical Mediterranean environment in central Italy. **Eur. J. Agron.**, v. 34, n. 3, p. 172–180, 2011. DOI: 10.1016/j.eja.2010.10.006.

MELO-ABREU, J. P.; RIBEIRO, A. C. **Os danos de geada: conceitos, mecanismos e modelos de simulação.** In Figueiredo, T. de; Ribeiro, Luís Frölen; Ribeiro, António Castro; Fernandes, Luís Filipe Clima e Recursos Naturais: Conferências de Homenagem ao Prof. Doutor Dionísio Gonçalves. Bragança: Instituto Politécnico. p. 141-166, 2010.

MORAES, R. M. et al. Effect of harvest timing on leaf production and yield of diterpene glycosides in *Stevia rebaudiana* Bert: A specialty perennial crop for Mississippi. **Ind. Crop. Prod.**, v. 51, p. 385-389, 2013. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.09.025.

PEARCE, R. S. Plant freezing and damage. **Ann. Bot.**, London, v. 87, p. 417-424, 2001. DOI: 10.1006/anbo.2000.1352.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. **Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance.** In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

REDE OFICIAL DE LABORATÓRIOS DE ANÁLISE DE SOLOS-SUL - ROLAS. **Manual de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina.** Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Comissão de Química e Fertilidade do Solo. Porto Alegre. 10^a ed, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 4ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848p.

TATEO, F. *et al.* Stevioside content and morphological variability in a population of *Stevia rebaudiana* Bertoni from Paraguay. **Ital. J. Food Sci.**, v. 10, n. 3, p. 261-267, 1998.

YADAV, A. K.; DHYANI, S. D.; AHUJA, P. S. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. **Can. J. Plant Sci.**, v. 91, n. 1, 2011. DOI: 10.4141/cjps10086.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Os acessos 6, 7 e 14 possuem padrão químico industrial, altos teores e produtividade de EST e RA e apresentam potencial para cultivo e melhoramento genético.

O perfil morfológico das plantas de estévia apresenta correlação com os componentes de rendimento e pode ser explorado para seleção, melhoramento genético e adequações de manejo. Os acessos com maior altura, menor ramificação e baixos IAF e AFE são superiores em RA e R/E.

As flores e parte apical do caule de estévia são mais suscetíveis à geada que as folhas. As folhas apicais são mais suscetíveis à geada que as folhas basais. Os acessos 4, 7 e 8 são mais tolerantes à geada. Os acessos 7 e 14 são suscetíveis ao acamamento.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espécie apresentou muita facilidade de propagação *in vitro*. A repicagem foi realizada a cada 15 dias, pois o crescimento é muito rápido. As plantas apresentaram rápido crescimento mesmo em meio de cultura com redução de nutrientes e vitaminas. Concentrações menores que 0,5 μM de TDZ no meio de cultura podem induzir maior ramificação e mais explantes, resultando em maior velocidade de multiplicação *in vitro*.

Foi testado a colheita de explantes dos vidros para avaliar o rebrote das plantas *in vitro*, sendo que as plantas apresentam rebrote vigoroso até a quinta colheita, formando plantas com caules mais espessos e com melhor resistência à aclimatização. Este processo pode ser utilizado para reduzir os custos da multiplicação *in vitro* com meio de cultura, acelerar o processo de multiplicação e formar explantes melhores para a aclimatização *ex vitro*.

A aclimatização, ou seja, a microestaquia *ex vitro* apresenta grande porcentagem de sobrevivência, em torno de 95%. Há dificuldade para manter a turgidez das plantas, sendo necessária umidificação das plantas no momento da retirada dos frascos e alocação imediata para nebulização. É interessante realizar a microestaquia com explantes de no máximo 4 cm, para evitar acamamento. 14 dias de nebulização intermitente é suficiente para aclimatização das plantas *ex vitro*.

O acesso 7 se destacou em quase todas as variáveis analisadas. Exibiu R/E próxima a 1, elevado teor de RA, alta produtividade de MSF e tolerância à geada e constitui-se como potencial para cultivo e melhoramento genético.

A produtividade de SRE encontrada para o acesso 7 foi 1091,6 kg ha⁻¹. Considerando o valor de mercado do cristal de SRE de R\$ 200,00, o cultivo, extração e purificação de cristal de SRE para esse acesso alcançaria rentabilidade bruta de R\$ 218.320,00 ha⁻¹.

O IAF apresentou correlação inversa com valor de SRE. Necessita-se avaliar a interferência do IAF no teor de SRE para o mesmo material genético, através de experimentação de espaçamento, pois o menor IAF e consequente maior disponibilidade de luz para as folhas pode proporcionar maior produtividade de edulcorantes.

Experimentos com distintos espaçamentos são importantes, pois, os acessos 7 e 14, com baixo IAF, não se aproximaram visualmente de 100% de interceptação luminosa e podem necessitar adensamento, enquanto os acessos 4, 9 e 12, com IAF muito alto, podem apresentar-se mais produtivos em menores densidades de plantio.

Visualmente, identificou-se que as plantas da bordadura do experimento apresentaram o mesmo porte que as plantas úteis para os acessos 7 e 14, porém, muito maiores para os acessos 4, 9 e 12, o que evidencia a diferença na demanda dos acessos por espaçamento.

É interessante utilizar bordadura dupla em experimentos com estévia, pois as plantas da bordadura de acessos como 4, 9 e 12 tendem a abrir a copa para fora da parcela, em busca de sol.

Os acessos 7 e 14 apresentaram, visualmente, elevado desenvolvimento na primeira metade do período de cultivo e, posteriormente, desenvolvimento lento, ao passo que os acessos 4 e 12 desenvolveram muito lentamente no início e de forma exponencial na segunda metade do período de cultivo.

Desta forma, é importante a realização de análise de crescimento ou experimentação de épocas de colheita para acessos com perfis morfológicos distintos. É provável que cada perfil morfológico apresente uma curva de crescimento e um ponto ótimo de colheita característicos.

Os valores de MSF e SRE encontrados para cada acesso podem ser bastante distintos em outros espaçamentos (resultando em diferente IAF) e épocas de colheita.

A época de plantio e colheita, em condições que clima Cfb, pode ser diferente do utilizado neste experimento. O plantio deve ser realizado o mais cedo possível na primavera, logo que não houver risco de geada. A primeira colheita pode ser antecipada para o final de dezembro, no caso das plantas já apresentarem altos teores de EST e RA. Assim, no segundo período de desenvolvimento, as plantas teriam condições ambientais e fisiológicas para maior produção de MSF. Uma terceira colheita poderia ser planejada para aproveitar a brotação das plantas antes do início do período de geadas.

Os grupos formados pelo dendrograma de agrupamento e pela análise PCA possuem estreita correlação com o perfil morfológico. Os acessos 4 e 12 (grupo 1) caracterizados por elevado teor de EST e baixo teor de RA, possuem folhas grandes, alto IAF, concentração da MSF na região basal, elevada produtividade (principalmente no final do ciclo produtivo) e grande ramificação.

Já os acessos 8 e 9 (grupo 2), caracterizados por valores médios de EST e RA, apresentam folhas pequenas, arredondadas, porte baixo, expansiva ramificação e alto IAF. O acesso 6 (grupo 3) com valores médios de EST e RA, porém com R/E próximo a 1, apresenta caule mais frágil e estatura média.

Os acessos 7 e 14 (grupo 4), caracterizados por elevados teores de EST e RA e R/E próximo a 1 são de maior altura, pouco ramificados, com baixo IAF e suscetíveis ao acamamento.

Desta forma, é possível supor que há grande correlação entre os perfis morfológicos, fisiologia e os componentes de rendimento. O detalhamento das características morfológicas destes acessos e a criação de grupos a partir destes caracteres é importante para que se possa alocar os acessos semelhantes em grupos morfológicos e facilitar a compreensão das correlações entre morfologia, fisiologia e componentes de rendimento.

Os acessos 6, 7 e 14 podem ser explorados em programas de melhoramento para altos RA e R/E, os acessos 4 e 12 para produtividade de MSF e os acessos 8 e 9 para ramificação.

Diante os baixos teores de EST e RA apresentados pelas cultivares crioulas majoritariamente utilizadas nos cultivos comerciais, pode ser viável a seleção de matrizes ou clones superiores por meio análise da morfologia das plantas pelos próprios agricultores para melhorar a qualidade da matéria prima entregue à indústria, tendo em vista que, os agricultores são pagos pelo teor de RA no Brasil.

Há várias características que determinam a tolerância de plantas à geada. Aspectos como concentração de ácido abscísico, presença de proteínas crioprotetoras, proteínas anticongelantes, nucleadores de gelo, porção de ácidos graxos não saturados nas membranas, concentração de solutos nas células, ação da α -amilase, entre outros, podem ser avaliadas para o entendimento dos mecanismos de tolerância de distintos materiais genéticos. O conhecimento da presença de algum destes mecanismos pode enriquecer muito a pesquisa e servir como embasamento ao melhoramento genético para tolerância à geada.

A suscetibilidade ao acamamento dos acessos 7 e 14 pode prejudicar o desenvolvimento da planta e dificultar a colheita mecanizada. Para tanto, o uso destes acessos em condições de solo com alto teor de matéria orgânica carece de cuidados como a redução e o parcelamento da adubação nitrogenada, adequação de espaçamento, a antecipação da colheita e o uso de quebra-ventos.

REFERÊNCIAS

- ABDULLATEEF, R. A.; OSMAN, M. Influence of genetic variation on morphological diversity in accessions of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **International Journal of Biology**, v. 3, n. 3, p. 66-72, 2011.
- ALADAKATTI, Y. R. et al. Effect of irrigation schedule and planting geometry on growth and yield of stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.). **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, v. 25, n. 1, p. 30-35, 2012.
- ANAMI, R. T. **Caracterização e divergência genética em clones de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni**. 48 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2008.
- ANDOLFI, L. et al. Agronomic productive Characteristics of Two Genotype of *Stevia rebaudiana* in Central Italy. **Italian Journal of Agronomy**, v. 1, n. 2, p. 257-262, 2006.
- BLOOM, D. E. et al. **The global economic burden of non-communicable diseases**. Genebra, Suíça. World Economic Forum. 2011.
- BONDAREV, N. I. et al. Steviol Glycoside Content in Different Organs of *Stevia rebaudiana* and Its Dynamics during Ontogeny. **Biologia Plantarum**, v. 47, n. 2, p. 261-264, 2003.
- BONDAREV, N. I. et al. Morphology and ultrastructure of trichomes of intact and in vitro plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni with reference to biosynthesis and accumulation of steviol glycosides. **Moscow University Biological Sciences Bulletin**, v. 65, n. 1, p. 12-16, 2010.
- BONILLA, C. R. et al. Evaluation of propagation methods, nitrogen fertilization and phenology in stevia in the Cauca Valley, Colombia. **Acta Agronómica**, v. 65, n. 3, 2007.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa. 904p., 2v/il. 2010.
- BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Secretaria do Comércio Exterior. **Programa AliceWeb**. 2014. Disponível em <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>>. Acessado em 26/10/2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Serviço Nacional de Proteção de Cultivares. **Programa CULTIVARWEB gerenciamento de informação, versão 1.0**. 2015. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/php/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php> acessado em 31/01/2015.

CAETANO, M. **Estévia avança no Brasil e turбина mercado de adoçantes naturais**. Globo Rural, 10 jan. 2011. Caderno 291. Disponível em <<http://revistagloborural.globo.com/revista/common/0,,emi200089-18077,00-estevia+avanca+no+brasil+e+turbina+mercado+de+adocantes+naturais.html>> acessado em: 31/01/2015.

CARDELLO, H. M. A. D. et al. Análise descritiva quantitativa de edulcorantes em diferentes concentrações. **Food Science and Technology**, v. 20, n. 3, 2000.

CEUNEN, S.; GEUNS, J. M. C. Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). **Plant Science**, v. 198. p. 72-82.,2013.

CEUNEN, S. et al. **Accumulation pattern of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* Bertoni and its stimulation by red-light**. In Geuns, J. (Ed.), Proceedings of the 5th EUSTAS Stevia symposium "Stevia: Break-through in Europe": Vol. 5. Stevia: Break-through in Europe. Leuven, 28 – 29 June 2011 (pp. 41-74). Heverlee: Euprint bvba.

CHATSUDTHIPONG, V.; MUANPRASAT, C. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. **Pharmacology e Therapeutics**, v. 121, n. 1, p. 41-54, 2009.

CHEN, T. H. et al. Mechanism of the hypoglycemic effect of stevioside, a glycoside of *Stevia rebaudiana*. **Planta Medica Journal**, v. 71, n. 2, 2005.

CORREIA JUNIOR, C. et al. **Complexo Agroindustrial das Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares no Estado do Paraná: diagnóstico e perspectivas**. Curitiba: SPPM; EMATER; EMBRAPA Florestas. v. 1. 272p, 2004.

DAS, K. et al. Influence of bio-fertilizers on the biomass yield and nutrient content in *Stevia rebaudiana* Bert. Grown in Indian subtropics. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 1, p. 5-8. 2007.

DACOME, A. S. et al. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 3587–3594, 2005.

EFSA. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. **EFSA Journal**, v. 8, n. 4, p. 1-84, 2010.

FRONZA, D.; FOLEGATTI, M. V. Water consumption of the estevia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni) crop estimated through microlysimeter. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 3, 2003.

GOETTEMÖLLER, J.; CHING, A. Seed germination in *Stevia rebaudiana*. In: J. Janick (ed.), **Perspectives on new crops and new uses**. ASHS Press, Alexandria, VA. p. 510–511, 1999.

GONZÁLEZ, H. R. et al. Comportamiento del cultivo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni em Cuba. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 12, n. 4, 2007.

GOTO, A.; CLEMENTE, E. Influência do rebaudiosídeo A na solubilidade e no sabor do esteviosídeo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n.1, p. 3-6, 1998.

GULERIA, P.; YADAV, S. K. Identification of miR414 and Expression Analysis of Conserved miRNAs from *Stevia rebaudiana*. **Genomics, Proteomics e Bioinformatics**, v. 9, n. 6, 2011.

HOSSAIN, M. A., et al. Chemical composition of the essential oils of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. **Asian Journal of Traditional Medicines**, v. 5, n 2. 2010.

INDUSTRYARC. **Global Stevia / *Stevia rebaudiana* Market (2013-2018): By Types (Liquid e Powdered); By Application (Dairy, Bakery, Canned Food, Beverages e Others) and By Geography**. Industry ARC. 2014. <<http://industryarc.com/Domain/2/agriculture-market-research.html>>.

International Diabetes Federation. IDF. **Diabetes Atlas**. 6^a ed. Bruxelas, Bélgica: International Diabetes Federation, 2013.

KIM, J. Y. et al. Modified High-Density Lipoproteins by Artificial Sweetener, Aspartame, and Saccharin, Showed Loss of Anti-atherosclerotic Activity and Toxicity in Zebrafish. **Cardiovascular Toxicology**. 2014.

KINGHORN, A. D. **Stevia: the genus Stevia**. CRC Press. 2003.

KLIMKO, K. FDA's Contradictory Decisions Related to the Delaney Clause. **Harvard Law School Student Papers**. 2011.

KOLB, N. et al. Analysis of Sweet Diterpene Glycosides from *Stevia rebaudiana*: Improved HPLC Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4538–454, 2001. DOI: 10.1021/jf010475p.

LAVINI, A. et al. Yield, Quality and Water Consumption of *Stevia rebaudiana* Bertoni Grown under Different Irrigation Regimes in Southern Italy. **Italian Journal of Agronomy**, v. 2, p. 135-143. 2008.

LIMA FILHO, O. F. **Análise Quantitativa do Crescimento da Estévia**. Dourados. Documentos: 60. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Agropecuária Oeste. p. 29. 2004.

LIMA FILHO, O. F.; VALOIS, A. C. C.; LUCAS, Z. M. **Sistemas de Produção 5: Estévia**. Dourados. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Agropecuária Oeste. p. 55. 2004.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP, 2ª Ed., Editora Plantarum, p. 544, 2008.

MADAN, S. et al. *Stevia rebaudiana* (Bert.) - A Review. **Indian Journal of natural products and resources**, v. 1, n. 3, p. 267-286. 2010.

MANDAL, S. et al. Arbuscular mycorrhiza enhances the production of stevioside and rebaudioside-A in *Stevia rebaudiana* via nutritional and non-nutritional mechanisms. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p. 187–194. 2013.

MEJEGI, N. W. et al. Introducing *Stevia rebaudiana*, a natural zero-calorie sweetener. **Current Science**, v. 88, n. 5. 2005.

MISRA, H. et al. Antidiabetic activity of medium-polar extract from the leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. (Bertoni) on alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Pharmacy e Bioallied Sciences**, v. 3 n. 2. p. 242-248. 2011.

MONDAÇA, R. L. et al. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1121–1132. 2012.

MORAES, R. M. et al. Effect of harvest timing on leaf production and yield of diterpene glycosides in *Stevia rebaudiana* Bert: A specialty perennial crop for Mississippi. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 385-389. 2013.

MOTA, T. R.; DACOME, A. S.; COSTA, S. C. **Seleção de Clones de Elite de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni com Ênfase no Teor do Rebaudiosídeo A e Atividade Antioxidante.** Anais do Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar. Maringá. 2011.

PAL, P. K. et al. Effect of decapitation and nutrient applications on shoot branching, yield, and accumulation of secondary metabolites in leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p. 1526-1535. 2013.

PAL, P. K. et al. Harvest regimes to optimize yield and quality in annual and perennial *Stevia rebaudiana* under sub-temperate conditions. **Industrial Crops and Products**. 2014.

PERICHE, A. et al. Influence of drying method on steviol glycosides and antioxidants in *Stevia rebaudiana* leaves. **Food Chemistry**, v. 172, n. 1, p. 1-6, 2015.

PORTUGAL, E. P. et al. Seleção de Fungos Micorrízicos Arbusculares para Estévia, *Stevia rebaudiana* (bert.) Bertoni. **Multiciência**, FEAGRI – UNICAMP. 2006.

RAMESH, K. et al. Cultivation of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: a comprehensive review. **Advances in Agronomy**, v. 89, p. 137–177. 2006.

RAMESH, K. et al. Production potential of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. under intercropping systems. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 53, n. 4. p. 443-458. 2007.

SAAD, A. et al. A Review on Potential Toxicity of Artificial Sweeteners vs Safety of Stevia: A Natural Bio-Sweetner. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 4. n. 15. p. 137-145. 2014.

SERFATY, M. et al. Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant stands and Colheita regime. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 731-736. 2013.

SHAFFERT, E. E.; CHEBOTAR, A. A. Structure, topography and ontogeny of *Stevia rebaudiana*. **Botanicheskii Zhurnal**, v. 79, p. 38-48. 1994.

SHIVANNA, N. et al. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 27, n. 2, p. 103-113. 2013.

SHOCK, C. C. Rebaudi's stevia: natural non-caloric sweeteners. **California Agriculture**, v. 36, p. 4-5 . 1982. DOI: 10.3733/ca.v036n09p4

SHYU, Y. T. et al. Effects of harvest dates on the characteristics, yield, and sweet. **Journal of Agricultural Research**, Taiwan. v. 43, p. 29-39. 1994.

SIDDIQUE, A. B. et al. Chemical composition of essential oil by different extraction methods and fatty acid analysis of the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Arabian Journal of Chemistry**. 2012.

SINGH, S.; GARG, V. Antidiabetic, antidyslipidemic and antioxidative potential of methanolic root extract of *Stevia rebaudiana* (bertoni) on alloxan induced diabetic mice. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 7, p. 1859-1872. 2014.

SINGH, S. D.; RAO, G. P. Stevia: The herbal sugar of the 21st century. **Sugar Technology**, v. 7, p. 17-24. 2005.

STEVENS, G.A. et al. National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences. **Population Health Metrics**, v. 10, n. 22, 2012.

TATEO, F. et al. Stevioside content and morphological variability in a population of *Stevia rebaudiana* Bertoni from Paraguay. **Italian Journal of Food Science**, v. 10, n. 3, p. 261-267. 1998.

YADAV, A. K.; DHYANI, S. D.; AHUJA, P. S. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 91, n. 1, 2011.